

**UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE  
UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES DE  
BESANCON  
Année Universitaire 2009-2010**

**THESE**

Pour l'obtention  
Du diplôme de Doctorat de l'Université de Franche-Comté  
Spécialité : Science de la Vie et de la Santé

N° de bibliothèque : 251005

Présentée et soutenue publiquement  
le 25 Juin 2010 par

**Romain BEDEL**

**Rôle de STAT3 dans l'immunoédition tumorale :  
Implication sur l'immunosurveillance NK.**

Sous la direction du Professeur Christophe BORG

**Composition du Jury :**

Directeur de thèse : Pr Christophe BORG

Rapporteurs : Pr. Anne CAIGNARD  
Dr. Christelle RETIERE

Examineurs : Pr Philippe SAAS



## Résumé

Les lymphocytes NK sont des cellules du système immunitaire inné décrites pour leurs rôles essentiels dans la réponse anti-bactérienne, antivirale et plus récemment anti-tumorale. En effet, les cellules NK présentent des fonctions « d'immunosurveillance ». Elles sont capables de cytotoxicité directe à l'encontre des cellules tumorales et peuvent produire de grandes quantités d'IFN- $\gamma$ , un agent cytostatique, pour contenir l'avancement tumoral. Pourtant, en dépit de ces fonctions, on ne peut que constater le développement de tumeur chez les patients immunocompétents. Cette réalité peut être expliquée de manière rationnelle par le concept des 3E de l'immunosurveillance, à savoir : Elimination, Equilibre et Evasion ; Si la première étape a été largement documentée, la compréhension de la phase d'équilibre, transition critique permettant à terme l'échappement du cancer à l'immunité anti-tumorale, n'a pas été autant étudié.

Au cours de notre thèse, nous avons émis l'hypothèse de travail selon laquelle certaines protéines oncogéniques seraient capables de promouvoir des voies d'évasion immunitaire. Plus précisément, Notre thèse de sciences a pour objectif de déterminer les facteurs oncogéniques activés par les cellules tumorales pour prévenir les fonctions anti-tumorales des lymphocytes NK. Nous avons pu évaluer l'implication de STAT3, un facteur de transcription pro-oncogénique, dans l'immuno-modulation de l'immunité innée NK.

Les résultats présentés ici mettent en évidence l'implication de STAT3 dans la régulation transcriptionnelle de la protéine MICA, un ligand activateur des NK reconnu par NKG2D, et les conséquences de cette régulation sur les fonctions d'immunosurveillance NK.

**Mots clés :** Lymphocytes NK, STAT3, MICA, NKG2D, Immunosurveillance.



## *Abstract*

Natural Killer cells (NK) are lymphocytes from the innate immune system described for their key roles in the antibacterial, antiviral response and more recently for their anti-tumor activity. Indeed, NK cells exhibit immunosurveillance functions. They are capable of direct cytotoxicity against tumor cells and can produce large amounts of IFN- $\gamma$ , a cytostatic agent, to contain tumor progression. Yet, despite these features, tumor development is observed in immuno-competent individual. This fact can be explained thanks to the concept of immunosurveillance 3E: Elimination, Equilibrium and Escape; If the first step has been widely documented, the understanding of the equilibrium phase, a critical transition leading to immune evasion, has been poorly described.

In our thesis, we hypothesized that oncogenic proteins could promote immune escape mechanisms. Specifically, we aimed to identify oncogenic factors activated by tumor cells to prevent anti-tumor function of NK cells. We have assessed STAT3 involvement, a pro-oncogenic transcriptional factor, in immune modulation of NK cells innate immunity.

The results presented here highlight STAT3 involvement in MICA transcriptional regulation, a ligand recognized by the NK receptor NKG2D, and the consequences of such regulation on NK cells immunosurveillance.

**Keywords :** NK lymphocytes, STAT3, MICA, NKG2D, Immunosurveillance.



## Remerciements

Je remercie le Professeur Philippe Saas de me faire l'honneur d'être le président de jury de ma thèse. Je remercie également Anne Caignard et Christelle Retière pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'évaluer mon travail. Merci pour le temps que vous m'avez accordé.

Je tiens ici à remercier le Professeur Borg, mon directeur de thèse, pour son effervescence intellectuelle perpétuelle et le dynamisme dont il a fait preuve durant les années passées à ses côtés.

Je pense ensuite à toutes les personnes de l'EFS et de l'IBCT qui m'ont supporté pendant ces 5 longues années. Je m'excuse de ne pas avoir été aussi vif d'esprit en science qu'en quizz cinéma et série !

Merci aux anciens, maintenant bien loin, qui m'ont accueilli lorsque je n'étais que l'ombre d'un Padawan de la recherche. Nico (mon Chewbacca coup de cœur), Amandine (pour ces collaborations mutines à « la technicienne du Labo » de Dorcel M.), Celine P. (qui aurait pu causer ma perte en ramenant Magic !) David (cheeky cheeky ?), Tata Caro (pour les repas savoureux avec Doudou !), Erika (qui n'osera jamais manger un salsifi avant une carotte) et ma petite Maud, qui ne vit pas si loin que ça ;)

A ma famille de science, Adeline (qui partage ma passion secrète), Jérémy Be (toujours humble, Mr « Les tuyaux feat. Merguez party »), Fanny Angelotte (qui excelle dans le petit saut de cabri du midi), Francis 'Felilon' Goodfaith (« The Final Countdown of Lady Gaga » sur RFG), Christine 'KIKI' et sa petite famille (dont la grande gueule n'a d'égale que son grand cœur et, hum, son trou noir) Anne Dup' (qui tap tap Tango'), Pat Let' (ma ChiPette du dancefloor), Camouille (la globe trotteuse), Charline G. (Moaaaa, Un accent ? boah, NAAAN !), Emilie (qui m'a vu regarder un film sans dormir, sous peine de Krav Maga), Damien (Le pharmacien au sarbacane), JR (le très sociable), Charline V. (qui m'a convaincu du bien fondé de la soupe en sachet du midi), Laurent (pour ses élucubrations métaphysiques), Sophie (Ma Priscilla, folle du désert), Zélie (qui, il y a bien longtemps, a réveillé l'homme qui sommeillait en moi) Cedric (le geek repenté), Claire (pour les breaks Oreo du weekend), Bertrand (le ferrailleur qui aime les petits pois fluos UK), Florine (que la SPA remercie pour les p'tits chats sauvés), Romain (Tonight's the night), Yann G (Montre moi ton côté soooooommmbrreee) et Etienne (mon lover de la bioch').

A ma famille de cœur, Benjamin (Toujours in love après les photos de la Pink party, je te rejoins bientôt !), Yann T. (Bon on se voit quand pour Lost ?), Rosely (for the late and so-called spiritual convo), Efe (My turkish delight), Line (My Dannish delight ;)), Brick (mon frero de Magic, en route vers la gloire), Sébastien (le connard de Jougues), Nico (il est trop fruité celui la), Mélanie Cout' (Ma femme 99% fictive), Elsa (mon petit kouglof), Lucille (la gendarmette qui en jette), Vincent (pourchassé par les gays), Jean-Seb (ma maitresse très particulière), Carole Henry « Dunand » (l'ambassadrice Givenchy, Forever), Dominique Paris (un père spirituel, version dieu grec sur le retour).

A ma presque-famille de sang, Benoit (pour les nuits combo Killer Instinct/Secret of Mana et les placards de gâteaux bien remplis !), Simon (le communiste qui pogote et qui change d'avis comme de chemise), Alain (My very own Luxembourgish Guestage), Zohair (A jamais dans le bon compartiment, merci pour les coups de pied dans le cul, My Bittruck Bromance).

To Joshua, I owe you more than you'll ever know, love you.

A ma famille, à Charlène, (tu as fait de moi le frère le plus heureux du monde), à Guillaume, (l'homme qui a transformé ma sœur), à mon filleul Gabriel (tu représentes tant à mes yeux).

A ma mère, que je n'ai pas toujours ménagée mais à qui je dois tout. Tu m'as appris la valeur du travail et le don de soi, il est temps que je prenne le relai. Que tu m'acceptes tel que je suis est le plus des cadeaux, je te dédie cette thèse.

« A tous les hommes que j'ai aimé avant »



# ***Sommaire***



<b>Préambule.....</b>	<b>21</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>25</b>
1 Les lymphocytes à cytotoxicité naturelle .....	27
1.1 Généralités .....	27
1.2 Ontogénie des lymphocytes NK .....	28
1.2.1 Engagement dans la voie des lymphocytes NK.....	29
1.2.2 Les NKP .....	30
1.2.3 Maturation des lymphocyte NK .....	33
1.2.4 Sous populations de NK matures.....	38
1.2.5 Homéostasie des lymphocytes NK.....	43
1.3 La théorie du « missing-self ».....	45
1.4 Récepteurs des lymphocytes NK .....	49
1.4.1 Récepteurs spécifiques du CMH I classique .....	49
1.4.1.1 Récepteurs Ly49 .....	49
1.4.1.2 Récepteurs KIR.....	51
1.4.1.3 Récepteurs CD94/NKG2 .....	54
1.4.1.4 Récepteurs ILT .....	57
1.4.2 Récepteurs spécifiques du CMH I non classique .....	57
1.4.3 Récepteurs spécifiques de molécules indépendantes du CMH I .....	61
1.4.3.1 Les récepteurs naturels de cytotoxicité.....	61
1.4.3.2 Les récepteur de Fc.....	65
1.4.3.3 Les récepteurs TOLL.....	66
1.4.3.4 Les récepteurs de la famille SLAM.....	66
1.4.3.5 DNAM-1.....	69
1.4.3.6 Le CD2 .....	69
1.5 Transmission du signal .....	70
1.6 La Synapse Immunologique.....	74
1.6.1 aNKIS .....	76

1.6.2	iNKIS .....	79
1.7	Coopération entre Les lymphocyte NK et l'immunité.....	81
1.7.1	Interaction entre lymphocyte NK et cellules dendritiques .....	81
1.7.2	Interaction entre les lymphocytes NK et les Macrophages .....	83
1.7.3	Interaction entre les lymphocytes NK et lymphocytes T et B .....	84
1.8	Rôle des lymphocytes NK dans la défense de l'organisme .....	86
2	Oncogenèse et immunosurveillance des Cancers.....	90
2.1	Généralités sur l'oncogenèse .....	90
2.2	Principe d'immunosurveillance et d'immunoédition.....	93
2.2.1	Chez la souris.....	99
2.2.2	Chez l'homme.....	101
2.3	Rôles des NK dans l'immunosurveillance .....	102
	<b>Objectifs de notre travail de thèse .....</b>	<b>113</b>
	<b>Résultats.....</b>	<b>115</b>
1	Le facteur de transcription STAT3.....	117
1.1	Généralités .....	117
1.2	Biologie Moléculaire de STAT3.....	118
1.3	Mécanismes de signalisation de STAT3 .....	120
1.3.1	Activation de STAT3.....	120
1.3.2	Régulation de l'activation de STAT3 .....	122
1.3.2.1	Les Tyrosines phosphatases.....	122
1.3.2.2	Les Protéines SOCS.....	123
1.3.2.3	Les protéines PIAS .....	123
1.4	STAT3 et polarisation des réponses immunitaires .....	126
1.4.1.1	Polarisation Treg.....	126
1.4.1.2	Polarisation Th17.....	128
1.5	Fonctions oncogéniques de STAT3 .....	133
1.5.1	Fonctions pro-tumorales intrinsèques de STAT3 .....	135

1.5.2	Fonctions pro-tumorales extrinsèques de STAT3 .....	136
2	Publication n°1 .....	143
2.1	Introduction à la publication .....	143
2.2	Résultats de l'article.....	183
<b>Discussion .....</b>		<b>189</b>
1	L'échappement au système immunitaire.....	192
1.1	Constatations cliniques .....	192
1.2	Modèles expérimentaux .....	199
2	Compréhension de l'immunosurveillance NK.....	203
2.1	Rôle de CX3CL1 dans l'établissement de la réponse anti-tumorale. ....	204
2.2	NKG2D, une voie critique pour les fonctions anti-tumorale NK .....	206
2.3	Régulation de la voie NKG2D.....	209
2.3.1	Architecture des promoteurs MICA et MICB .....	209
2.3.2	Activation des NKG2DL .....	212
2.3.3	Modèle d'étude et implication dans l'immunoévasion de la voie NKG2D..	212
3	Pertinence de l'étude de STAT3 dans l'immunoévasion.....	216
3.1	Fonctions immuno-régulatrices via STAT3 exprimé par les tumeurs.....	216
3.2	Fonctions immuno-régulatrices via STAT3 dans les cellules immunitaires au niveau intra-tumorale .....	218
3.2.1	STAT3 affecte les fonctions de DC infiltrantes .....	218
3.2.2	La signalisation de STAT3 affecte l'immunité innée anti-tumorale .....	220
3.2.3	STAT3 réprime la réponse lymphocytaire T anti-tumorale .....	222
3.2.4	Apport de notre étude .....	223
<b>Perspectives .....</b>		<b>227</b>
1	Association entre polymorphisme de l'immunité innée et pronostic.....	229
1.1	Etude préliminaire.....	229
1.2	Polymorphismes associés à NKG2D .....	231
1.3	Polymorphismes associés à STAT3.....	232
1.4	Polymorphismes associés à MICA .....	234

2	Approche thérapeutique ciblant STAT3 .....	238
2.1	Rationnel .....	238
2.2	Données préliminaires .....	243
	<b>Conclusion Générale.....</b>	<b>247</b>
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>251</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>285</b>
1	Publication n°2 .....	287
2	Publication n°3 .....	295
3	Revue de la littérature n°1 .....	327
4	Revue de la littérature n°2 .....	357

## *Table des illustrations*

Figure 1 - Ontogénie des lymphocytes NK chez l'homme. ....	38
Figure 2 - Les deux sous-populations de lymphocytes NK chez l'homme. ....	41
Figure 3 - Théorie du « Missing-self ». ....	48
Figure 4 - Structures des récepteurs KIR. ....	53
Figure 5 - Structure des récepteurs NKG2 humain. ....	56
Figure 6 - Signalisation du récepteur CD244. ....	68
Figure 7 - Signalisation associée aux co-récepteurs de type ITAM. ....	72
Figure 8 - Signalisation associée aux co-récepteurs de type DAP10. ....	74
Figure 9 – Concept de synapse immunologique. ....	75
Figure 10 – Rôles des lymphocytes NK au sein du système immunitaire. ....	85
Figure 11 – Piliers du cancer. ....	91
Figure 12 - Immunogénicité accrue des tumeurs issues de souris immunodéficientes. ....	96
Figure 13 - Le système immunitaire entretient un état d'équilibre ....	97
Figure 14– Concept d'immunoédition basé sur la théorie des 3E (Elimination, Equilibre et Echappement). ....	98
Figure 15 - Incidence accrue des tumeurs spontanées et induites par le MCA chez les souris immunodéficientes. ....	101
Figure 16 - Représentation de la protéine STAT3. ....	119
Figure 17- Signalisation caractéristique de STAT3. ....	121
Figure 18 Régulation de la voie de signalisation de STAT3. ....	125
Figure 19 – STAT3 à l'intersection des différenciations Th17 et Treg. ....	132
Figure 20 – STAT3 présente des propriétés oncogéniques. ....	134
Figure 21– Analyse en IHC de biopsies de patients sains, de patients atteints de Colite Ulcéraire active et de Colite Ulcéraire inactive. ....	137
Figure 22 – STAT3 est essentiel pour le développement tumoral associé à la colite inflammatoire (CAC). ....	138
Figure 23 - STAT3 crée un lien entre inflammation et oncogénèse. ....	139
Figure 24 - STAT3 est impliqué dans les propriétés oncogéniques de la lignée HT29. ....	184
Figure 25 - STAT3 et TGF- $\beta$ 1 agissent en synergie pour inhiber les fonctions ....	185

Figure 26 – Courbe de survie de patients atteints de carcinomes gastriques en fonction de la proportion de Treg parmi les lymphocytes T totaux. ....	193
Figure 27 La perte d’expression du CMH I est source de mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer du côlon. ....	195
Figure 28 – Incidence de cancer pour les transplantés d’organes solides. ....	197
Figure 29 - Influence de NKG2D sur l’incidence de cancer de la prostate chez la souris TRAMP NKG2D <sup>-/-</sup> . ....	208
Figure 30 – Représentation schématique du promoteur de MICA. ....	211
Figure 31 – La répression de STAT3 dans la tumeur B16 augmente l’infiltrat de cellules immunitaires et la production de cytokines inflammatoires associée. ....	217
Figure 32 - STAT3 joue un rôle critique dans l’immunoévasion associée au microenvironnement tumoral. ....	225
Figure 33 – Polymorphismes associés au gène de la protéine NKG2D. ....	231
Figure 34 – Détection par IHC de l’expression de MICA/B sur allogreffes de rein (A) et de pancréas (B). ....	237
Figure 35 – Stratégies utilisées pour les approches thérapeutiques ciblant STAT3. ....	239
Figure 36 – Test de viabilité MTT sur la lignée HT29 traitée par différents inhibiteurs de STAT3. ....	244
Figure 37 – Quantification de l’IFN- $\gamma$ sécrétés par des lymphocytes mis en présence de cellules HT29 traitées par des inhibiteurs de STAT3. ....	245
Figure 38 – Expérience de gène rapporteur luciférase sur la lignée Hela-STAT3-Luc traitée par différents inhibiteurs de STAT3. ....	246

## Liste des abréviations

---

$\beta_2$ -m :  $\beta_2$ -microglobuline

### A

---

ADCC : Cytotoxicité dépendante de l'anticorps

AICL: activation-induced C-type lectin

aNKIS : Synapse immunologique NK activatrice

AOM : Azyoxymethane

ATM : Ataxia telangiectasia, mutated

ATR : ATM and Rad3-related)

### B

---

BCR: B Cell Receptor

bFGF: Basic fibroblast growth factor

### C

---

CAC : cancer associé aux inflammations du colon

CagA : Cytotoxin-associated gene A

CCR7: CC-chemokine receptor 7

ChIP : Immunoprécipitation de chromatine

CLP: common lymphoid progenitors

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CRC : Cancer colorectal

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

cSMAC : Central supramolecular activation cluster

cSMIC : Central supramolecular inhibitory cluster

CTL: T CD8+ cytotoxiques

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

CX3CR1 : CX3C-chemokine receptor 1

CXCR3: CXC-chemokine receptor 3

### D

---

DC : Cellules dendritiques

DC-NK IS : Ssynapse entre un lymphocyte NK et une DC

DNAM-1: DNAX accessory molecule-1

DNMT : DNA methyltransferase

dNK: NK déciduaux

DSS : Dextran sulfate sodium

### E

---

E4BP4 : E4-binding protein 4

EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EAT-2 : Erwing's sarcoma-activated transcript-2

EBV : virus de l'Epstein-Barr

ELP : Early lymphoid progenitors

eNK : NK endometriaux

ERM: Ezrin-radixin-moesin

ERT : EAT-2-related transducer

### F

---

FasL : Fas ligand

Fc : Fragment constant des anticorps

FT : Facteurs de transcription

### G

---

GL: Ganglions lymphatiques

GvHD : Maladie du greffon contre l'hôte

GvL : Effet greffe contre la leucémie

## H

---

HA : Héماغglutinine

HCV : Virus de l'hépatite C

H&E : Hematoxylin et eosin

HCMV : Cytomégalovirus humain

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HSE : Elément de réponse au choc thermique

HTLV : Virus T-lymphotropique humain

## I

---

Id2: inhibitors of DNA binding 2

IDO: Enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase

Ig : Immunoglobulines

IL6R : récepteur à l'IL-6

iNK : phénotype NK immature

iNKIS : Synapse immunologique NK  
inhibitrice

IFN- $\gamma$  : interféron gamma

IFNGR : Récepteur à l'IFN- $\gamma$

ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based  
activation motif

ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based  
inhibitory motif

ITSM: Immunoreceptor tyrosine-based switch  
motif

## J

---

JAK: Janus Kinase

## K

---

KIR: Killer Immunoglobulin-like Receptor

KSV : Virus associé au sarcome de Kaposi

## L

---

LFA-1: leukocyte function-associated antigen  
1

LGL : Grands lymphocytes granuleux

LLA : Leucémies lymphoïdes aiguës

LMA : Leucémie myéloïde aigue

LT : Lymphotoxine

LT $\beta$ R : Récepteur  $\beta$  à la lymphotoxine

## M

---

MAPK: Ras-mitogen-activated protein kinase

MCA : Methylcholanthrene.

MCMV : Cytomégalovirus murin

MDSC : Cellules myéloïdes suppressives

MICA: MHC class I polypeptide-related  
sequence A

MICB: MHC class I polypeptide-related  
sequence B

MLR : Réaction lymphocytaires mixtes

MMP : Métalloprotéinases matricielle

MM : Myélomes multiples

M-NK IS : Synapse entre un NK et un  
macrophage

MO : Moelle osseuse

## N

---

NCR : Récepteurs naturels de cytotoxicité

NK : Lymphocytes à cytotoxicité naturelle

NKG2D: Natural Killer Group 2 D

NKG2DL: Ligands de NKG2D

NKP : Précurseurs NK

NLS : Séquence de localisation nucléaire

## O

---

OSM: Oncostatine M

## P

---

PAMP : Pathogen-Associated Molecular  
Patterns

PBL : Lymphocytes totaux du sang périphériques

pDC: DC plasmacytoïdes

PDGF: Platelet-derived growth factor

PIAS: Protein inhibitor of activated STAT

PI-3,4-P<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-3,4-biphosphate

PI-3,4,5-P<sub>3</sub>: Phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

PL: phospholipases

PLGF: Placenta Growth Factor

pRb : Protéine du rétinoblastome

PRR: Pattern-Recognition Receptors

pSMAC : Peripheral supramolecular activation cluster

pSMIC: Peripheral supramolecular inhibitory cluster

PVR : récepteur du virus de la polio

## R

RAG : Recombination-activating gène

## S

SHIP: Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase 1

sHLA-G: HLA-G soluble

SI : Synapse immunologique

SLAP : Famille de protéines associées à SLAM

sMICA: Forme soluble de MICA

sNKG2DL : Formes solubles des NKG2DL

SNP : Polymorphisme nucléotidique simple

SOCS: Suppressors of cytokine signaling

STAT3: Signal transducer and activator of transcription-3

sULBP2: Forme soluble de ULBP2

## T

TCR: T Cell Receptor

TGF-β1 : Transforming Growth Factor β1

TLR : Toll-like receptor

TNKP : Progéniteur bivalent T et NK

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRAMP : Transgenic adenocarcinoma mouse prostate

Treg: Lymphocytes T régulateurs

## U

ULBP : UL16 binding protein

## V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

## W

WASp: Winston-Aldrich Syndrome protein

## X

XLP : Syndrome lympho-prolifératif lié au chromosome X



# ***Préambule***



Après un siècle de débat et de controverse, la notion de « surveillance » du développement tumoral par le système immunitaire est aujourd'hui admise. Grâce aux données acquises avec les modèles murins déficients pour les éléments clés de l'immunité (lymphocytes T, IFN- $\gamma$ ) ou grâce au suivi des patients transplantés, l'immunosurveillance cancéreuse apparaît comme un élément extrinsèque important dans la suppression tumorale. Pourtant, en dépit des nombreux mécanismes anti-tumoraux employés par notre organisme pour prévenir le développement cancéreux, il est observé l'émergence et l'évolution de tumeur chez les hôtes immunocompétents. Cette évolution rend compte de la faculté des cellules tumorales à promouvoir des mécanismes d'évasion immunitaire et favoriser l'émergence des clones moins immunogéniques et plus agressifs.

Comme décrit par Hanahan et Weinberg, la tumorigenèse est un processus multi-étapes d'altérations génétiques stochastiques conduisant à la production de dérivés malins à partir de cellules saines. Dans leur théorie, Hanahan et Weinberg ont établi six piliers du cancer, basés sur les facteurs critiques nécessaires à l'émergence d'une cellule tumorale. Les données actuelles tendent à soutenir l'existence d'un « Septième pilier » regroupant l'ensemble des mécanismes inhérents à la tumorigenèse et favorisant l'évasion tumorale.

Les travaux présentés ici s'attardent plus particulièrement sur les mécanismes tumoraux impliqués dans l'immunoévasion à des lymphocytes particuliers de l'immunité innée, les lymphocytes à cytotoxicité naturelle NK.



# ***Introduction***



# 1 LES LYMPHOCYTES A CYTOTOXICITE NATURELLE

## 1.1 GENERALITES

L'existence des lymphocytes à cytotoxicité naturelle a été révélée par les travaux de Kiessling R. et Herbermann R.B en 1975. Dans plusieurs modèles murins, ces auteurs ont isolé à partir de la rate, des ganglions lymphatiques et du sang périphérique, des cellules lymphocytaires présentant spontanément une activité cytotoxique contre les cellules leucémiques (Herberman et al., 1975a; Herberman et al., 1975b; Kiessling et al., 1975a; Kiessling et al., 1975b). Par la suite, le développement normal de ces lymphocytes dans des souris incapables de réaliser le réarrangement de leurs récepteurs antigéniques (T Cell Receptor, TCR et B Cell Receptor, BCR) contribua à les différencier des lymphocytes T et B ; dépendants de la reconnaissance spécifique TCR/BCR-peptide/CMH pour exercer leurs fonctions. Enfin, le terme « natural killer » fut utilisé pour décrire cette population cellulaire paradoxale immédiatement compétente pour détruire les cellules leucémiques cibles bien que totalement tolérante aux cellules du soi.

Les lymphocytes natural killer (NK) sont de grands lymphocytes granuleux (LGL) appartenant au système immunitaire inné au même titre que les mastocytes, éosinophiles et basophiles. Ils représentent entre 5 et 20% de la population lymphocytaire totale. Les fonctions « naturelles » des lymphocytes NK interviennent très précocement dans la réponse immunitaire ce qui leur confèrent un rôle critique dans la modulation de l'immunité antivirale et l'immunosurveillance des cancers (Cerwenka et al., 2001; Orange and Ballas, 2006). Les cellules NK peuvent sécréter de nombreuses cytokines inflammatoires et disposent de mécanismes de lyse proches de ceux des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) comme l'exocytose de protéines lytiques (granzyme B, perforine) ou l'utilisation de récepteurs de

mort (TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) et Fas/Fas ligand (FasL))(Bossi and Griffiths, 2005; Trapani and Smyth, 2002).

---

## 1.2 ONTOGENIE DES LYMPHOCYTES NK

La majeure partie des données connues sur le développement des lymphocytes NK provient de cultures en milieu liquide, basées sur un tapis cellulaire stromal, de purification de précurseurs hématopoïétiques ou encore de modèles murins déficients pour un gène défini. Les résultats des études murines mettent en évidence d'étonnantes conservations phénotypiques et fonctionnelles par rapport aux modèles humains ce qui permet d'extrapoler à une différenciation proche entre les deux espèces. Il existe plusieurs stades dans la différenciation et maturation d'un lymphocyte NK conditionnés par des facteurs moléculaires, environnementaux et cellulaires. On peut distinguer chronologiquement (a) l'engagement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) vers la voie des lymphocytes NK, (b) la maturation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes NK et (c) l'homéostasie des lymphocytes NK en périphérie.

La moelle osseuse est considérée comme le site primaire de production des lymphocytes NK puisqu'elle dispose des CSH CD34<sup>+</sup> et des facteurs solubles nécessaires à la maturation NK. Par conséquent, l'ablation de moelle osseuse affecte le nombre de NK périphériques et leurs capacités fonctionnelles (Haller and Wigzell, 1977). Pourtant, des lymphocytes NK immatures sont retrouvés dans de nombreux organes comme la rate, les ganglions lymphatiques (GL) ou encore le thymus. Cela pourrait signifier que la moelle osseuse n'est nécessaire que dans les premières étapes de différenciation et les autres sites pourraient permettre la maturation NK.

## 1.2.1 ENGAGEMENT DANS LA VOIE DES LYMPHOCYTES NK

La première étape de la différenciation NK correspond à un engagement des CSH CD34<sup>+</sup> dans la voie des NK. Ils perdent ainsi leurs fonctions de spécification dans les voies myéloïdes et érythroïdes et s'engagent en tant que précurseurs NK (NKP). A ce stade, les NKP sont des progéniteurs qui vont aboutir à la production de NK matures et fonctionnels.

Des états cellulaires intermédiaires ont été décrits dans la littérature et permettent de mieux comprendre les phases nécessaires à la production d'un NKP à partir des CSH. Au niveau de la moelle osseuse, chez la souris, on peut citer les progéniteurs lymphoïdes early lymphoid progenitors (ELP) et common lymphoid progenitors (CLP) (Igarashi et al., 2002; Kondo et al., 1997). Les ELP sont définis par un phénotype Lin<sup>-</sup> (c'est-à-dire dépourvu de marqueurs de différenciation CD3, CD19, Ter119 et Gr-1) c-kit<sup>+</sup> et Flt3<sup>+</sup> et les CLP sont Lin-c-kit<sup>+</sup>IL7Rα<sup>+</sup>. Chez l'homme, les CLP présents dans la moelle osseuse sont CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>. Ces deux types de progéniteurs ne définissent pas une population homogène puisqu'ils peuvent produire des lymphocytes T et B. Ils sont néanmoins enrichis en NKP. Il est à noter qu'aucune donnée ne peut infirmer ou confirmer la nécessité de ces états de différenciation et certains travaux démontrent que des souris déficientes pour c-kit n'ont pas un taux altéré de lymphocytes NK alors qu'elles sont dépourvues de CLP (Waskow and Rodewald, 2002). Au niveau du thymus foetal et du foie foetal, la présence d'un progéniteur bivalent T et NK (TNKP) a été décrite chez l'homme et la souris. Le phénotype TNKP murin est Lin-c-kit<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> et l'équivalent humain se définit par CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> (Spits et al., 1995). D'autre part, une différenciation NK a été décrite chez les précurseurs thymocytes CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> et CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Il est possible que ce soit une conséquence de l'hétérogénéité des sous populations définies ou que le potentiel NK de ces précurseurs intervienne dans des conditions où la signalisation Notch, nécessaire à l'établissement des populations T, est défectueuse (Radtke et al., 1999). Comme

les NK thymiques sont en quantité normale dans les conditions Notch<sup>-/-</sup>, on peut penser que la voie NK des TNKP est plus une voie de secours qu'une voie majeure de différenciation. Pourtant, si la présence du récepteur Notch ne semble pas nécessaire à la production de lymphocytes NK, il a été démontré que certains ligands (Jagged-1 et Delta-1) favorisaient l'orientation vers les progéniteurs T/NK et pDC tout en prévenant l'orientation vers la voie de différenciation des lymphocytes B (Jaleco et al., 2001; Olivier et al., 2006). Plus récemment, l'équipe de Lowe J.B. a pu montrer que les ligands Jagged-2, Delta-1 et Delta-4 permettaient d'accélérer la différenciation NK en présence d'IL-7, de Flt3L, et d'IL-15 par rapport aux conditions n'utilisant pas les ligands de Notch (Beck et al., 2009). Les ligands de Notch apparaissent donc à ce jour comme des co-facteurs permettant de favoriser la voie de différenciation NK.

Le microenvironnement cellulaire joue un rôle prépondérant dans l'obtention de la population NKP à partir de CSH. Ainsi, la production de cellules NK est très faible lorsque les CSH sont en condition liquide alors que l'apport de cellules stromales en co-culture augmente considérablement le nombre total de NK obtenus (Williams et al., 1999). De plus, la présence de SCF et du Flt3-L est importante et confirmée par l'expression de leurs récepteurs respectifs sur les cellules en cours de différenciation vers les NKP (Colucci and Di Santo, 2000; Yu et al., 1998).

---

### 1.2.2 LES NKP

Chez la souris, au niveau de la moelle osseuse et du foie fœtal, l'acquisition du marqueur CD122 (IL2R $\beta$ ) par les précurseurs hématopoïétiques apparaît comme l'étape clé de l'engagement dans la voie NK. Les NKP obtenus sont alors Lin<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>CD161<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>DX5<sup>-</sup> (Rosmaraki et al., 2001). Il est intéressant de noter que l'expression du CD122 n'est pas nécessaire à l'établissement de la population NKP. La

première étape de cette production NK est donc indépendante de l'IL-15 (Vosshenrich et al., 2005a). De même, si l'expression du CD127 est retrouvée dès le stade NKP, sa présence ne semble pas primordiale puisque les souches de souris CD127<sup>-/-</sup> disposent du même nombre de cellules NKP. Par la suite, ces NKP évoluent vers un phénotype mature entièrement fonctionnel (He and Malek, 1996). Les NKP sont aussi présents au niveau du thymus et des GL chez la souris mais représentent une faible proportion des lymphocytes. Bien que la population NKP soit enrichie en potentiel NK, elle n'est pas pure et seulement 1/8<sup>ème</sup> des NKP produira un NK mature. D'autre part, 10% des NKP expriment NKG2D, il est donc tentant de penser que les vrais NKP puissent être Lin<sup>-</sup>CD122<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>DX5<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup> même si aucune étude n'a été menée à ce jour.

La caractérisation de la population NKP chez l'homme n'a pas été clairement réalisée. En effet, l'expression du marqueur CD122 par les progéniteurs lymphoïdes CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> est difficile à évaluer. Pourtant leur sensibilité à l'IL-15 suggère un comportement similaire au NKP murin (Yu et al., 1998). Une étude récente a mis en avant l'existence d'une sous population de précurseurs CD34<sup>dim</sup>CD45RA<sup>+</sup>intégrin  $\alpha_4\beta_7$ <sup>high</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> qui se différencie *in vitro* en NK fonctionnels CD56<sup>high</sup>. Leur profil d'expression de récepteur de chimiokines et d'intégrines a amené les auteurs à proposer une migration de précurseurs hématopoïétiques vers les GL ou ces progéniteurs deviennent les NK CD56<sup>high</sup> décrits (Freud et al., 2005).

Les signaux délivrés par le Flt3, c-kit et les récepteurs dépendants de la chaîne  $\gamma_c$  ont une influence importante pour l'engagement dans la voie des lymphocytes NK. Pourtant, pris à part, la déficience pour l'une des cytokines n'entraîne que peu ou pas de réduction en nombre absolu de NKP. Il semblerait donc qu'une redondance dans la signalisation permette de compenser la perte d'un des facteurs et l'étude de modèles doubles déficients semble de choix

pour mieux étudier ce problème. VDUP-1 (protéine vitamin D3 upregulated protein 1) a été récemment identifiée comme étant une protéine régulatrice importante dans la production de la population NKP. Les modèles murins KO pour VDUP-1 présentent des défauts de réponses vis-à-vis de l'IL-15 et une diminution de l'expression de CD122 (Lee et al., 2005). Cette protéine semble donc déterminante pour l'engagement des CSH dans la voie NKP. Il faut aussi noter l'importance du microenvironnement et de l'interaction entre les cellules hématopoïétiques exprimant la lymphotoxine (LT)  $\alpha_1\beta_1$  et les cellules stromales exprimant le récepteur  $\beta$  à la LT (LT $\beta$ R) dans la production de lymphocytes NK matures circulants (Iizuka et al., 1999).

Les facteurs de transcription (FT) déterminants pour l'orientation dans la voie des lymphocytes NK ont fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, les protéines Ets-1 et PU.1, Id2 et les membres de la famille de protéines à doigt de zinc Ikaros, Helios, Aiolos ont tous été impliqués à différents stades du développement lymphocytaire (Rothenberg and Taghon, 2005). Ets-1 est critique pour le développement des NK (Barton et al., 1998). Sans son action, les lymphocytes NK sont presque absents de la moelle osseuse, des ganglions lymphatiques et de la rate. Cette diminution semble être une conséquence d'une réduction directe des NKP totaux puisque même l'IL-15 ne peut restaurer cette déficience *in vitro*. Pour la famille des protéines à doigt de zinc, seul Ikaros semble avoir un effet négatif sur la genèse des lymphocytes NK (Boggs et al., 1998). Une expression diminuée de Flt3 et CD122 est en cause. La protéine Id2 (inhibitors of DNA binding 2) agit en formant des hétérodimères avec les FT de type HLH E-Box (E2A, E2-2 et HEB). Elle prévient leur activité transcriptionnelle et leur fonction de régulation de la chromatine. Les souris déficientes pour Id2 ont une forte déficience en lymphocytes NK (Yokota et al., 1999) ce qui est cohérent avec les souris n'exprimant pas E2A et présentant une perte de NK (Ikawa et al., 2004). Pourtant, aucun des FT décrits précédemment ne constitue un pré-requis pour la voie des NK comme le serait

Gata-3 pour la voie des lymphocytes T et ces FT semblent également affecter les autres sous populations hématopoïétiques. Ce n'est que tout récemment que ce FT « maitre » a pu être mis en évidence. E4BP4 (E4-binding protein 4 ou Nfil3) est un FT qui a largement été décrit dans la signalisation de l'IL-3 et qui joue un rôle dans la survie des lymphocytes pro-B (Kuribara et al., 1999). Des études récentes ont montré que E4BP4 était fortement exprimé dans les cellules NK à partir du stade NKP jusqu'au stade de NK mature. La présence de E4BP4 est nécessaire pour la génération de NK *in vitro* à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (Kamizono et al., 2009). En outre, la suppression d'E4BP4 dans un modèle murin implique une absence totale et spécifique de lymphocytes NK dans la moelle osseuse, la rate et le sang. Cela désigne E4BP4 comme étant le FT déterminant et spécifique pour la voie de différenciation NK. Enfin, les données présentées par Gascoyne et al. expliquent que E4BP4 induirait l'expression de Id2 afin de promouvoir la voie de différenciation NK (Gascoyne et al., 2009).

### 1.2.3 MATURATION DES LYMPHOCYTE NK

On peut considérer qu'un lymphocyte NK est immature lorsque il ne présente pas l'intégralité des marqueurs exprimés par un lymphocyte NK mature circulant (chez la souris, CD49b<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD94/NKG2A/C<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>, expression variable des récepteurs Ly49 et chez l'homme CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>NKp46<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>). En se basant sur ces critères, des lymphocytes NK immatures sont retrouvés dans le foie (Takeda et al., 2005), la moelle osseuse (Kim et al., 2002), et la rate. Cela indiquerait une maturation des lymphocytes NK dans plusieurs localisations non définies à l'heure actuelle.

L'acquisition d'un phénotype NK immature (iNK) à partir des NKP est gouvernée en grande partie par la production d'IL-15 (Barao et al., 2003; Mrozek et al., 1996) et sa présentation par la sous unité IL-15R $\alpha$  via les cellules stromales hématopoïétiques et non hématopoïétiques

(Ranson et al., 2003). Le phénotype iNK est fortement modifié dans les modèles déficients pour l'IL-15. Par exemple, on peut observer la perte d'expression du récepteur Ly49 (Kawamura et al., 2003). Le rôle de l'IL-15 n'est pas déterminé mais on sait qu'elle n'affecte pas l'expression de Bcl-2 comme c'est le cas chez les NK matures. La réponse à l'IL-15 entre cellules immatures et matures est donc différente. L'implication de l'interaction  $LT\alpha/LT\beta R$  dans la formation d'une population NK mature, notamment la production d'un répertoire Ly49 varié, a été suggérée mais reste controversée. Les NK immatures expriment le CD161 chez l'homme et la souris ce qui les différencie des NKP (Bennett et al., 1996). L'IL-15 a été étudiée dans des modèles murins humanisés. Ces outils fournissent des éléments confirmant le rôle critique de la trans-présentation de l'IL-15 dans l'expression des récepteurs Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) par les NK  $CD56^{low}CD16^{+}$  (Huntington et al., 2009). L'acquisition des récepteurs KIR pourrait alors représenter une autre étape de différenciation vers la production d'un lymphocyte NK mature. Enfin, l'IL-2 peut promouvoir l'acquisition du CD16 et de KIR sur la population  $CD56^{high}CD16^{-}$  suggérant un lien entre les deux sous-populations (Ferlazzo et al., 2004b).

Une étape clé de la maturation est l'éducation des lymphocytes NK. C'est à ce stade que le lymphocyte NK acquiert sa faculté de tolérance vis-à-vis des cellules du soi. Une interaction entre les récepteurs Ly49 inhibiteurs chez la souris ou KIR chez l'homme avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) I est alors initiée afin d'évaluer les niveaux d'activation de chaque lymphocyte NK. A ce jour, le type cellulaire fournissant le signal du CMH I du soi pour l'éducation du lymphocyte NK n'est pas connu. De même, l'étape pendant laquelle s'initie cette éducation n'est pas non plus déterminée. Cependant, des études démontrent une expression des récepteurs spécifiques du CMH du soi chez les NK immatures et il semble plausible que l'éducation commence à cette étape (Rosmaraki et al., 2001). Plusieurs modèles expliquant ce phénomène sont décrits dans la littérature comme le modèle

de « licensing » ou de désarmement (Brodin and Hoglund, 2008). Pourtant, ces deux mécanismes ne semblent pas s'opposer mais plutôt refléter un principe commun d'éducation NK que l'on peut qualifier de dynamique et de quantitative. Dynamique car celui-ci n'est pas figé dans le temps et certains contextes expérimentaux ont démontré une altération de l'éducation chez des NK matures (Johansson et al., 1997). Quantitative car la force du signal entre le lymphocyte NK et la cellule présentant le CMH I définit le seuil d'activation du NK mature produit. Ainsi, lorsque le NK reçoit un faible signal inhibiteur au cours de cette phase, son seuil d'activation sera plus élevé pour prévenir la plus forte activation attendue. Par opposition, un fort signal inhibiteur impliquera un seuil plus bas d'activation pour garantir les fonctions du NK au cours d'une réponse immunitaire. Cette force d'interaction est dépendante de la molécule de CMH I engagée et chaque récepteur activateur NK peut être différemment affecté par un même récepteur Ly49 inhibiteur. Par exemple, le récepteur Ly49A exprimé par des NK déficients en CMH I est régulé négativement et à des niveaux différents lorsque ces lymphocytes sont transférés dans des souris H-2b, H-2a, H-2d ou H-2f (Johansson et al., 2000; Kase et al., 1998).

Bien que la majorité des lymphocytes NK soit éduquée au cours de cette étape, il reste entre 10 et 20% des lymphocytes NK circulants n'exprimant pas de récepteurs pour le CMH I du soi. Ces cellules sont potentiellement dangereuses pour l'organisme. Étonnamment, ces lymphocytes NK dit « hyporéactifs » présentent une réponse réduite lors de l'activation de leurs récepteurs activateurs prévenant leurs effets délétères. Les mécanismes de régulation permettant le contrôle de ces populations sont malheureusement peu connus. On sait par exemple que ces NK hyporéactifs ont un phénotype presque identique à celui des cellules NK éduquées. De plus, ils ont une efficacité restreinte dans les contextes impliquant le CMH I (i.e. contre les cellules tumorales) mais secrètent des quantités similaires d'IFN- $\gamma$  en réponse à une infection virale *in vivo* (Fernandez et al., 2005). Enfin, le caractère hyporéactif de ces

cellules NK peut être corrigé par des cultures avec de l'IL-2 *in vitro* (Fernandez et al., 2005). Inversement, les lymphocytes NK se développant dans un contexte CMH I déficient sont hyporéactifs et ne sont pas dangereux pour l'organisme (Liao et al., 1991). Si cette plasticité fonctionnelle confirme l'aspect dynamique de l'éducation des lymphocytes NK, elle suggère également un rôle biologique propre à ces NK hyporéactifs qu'il conviendrait de définir.

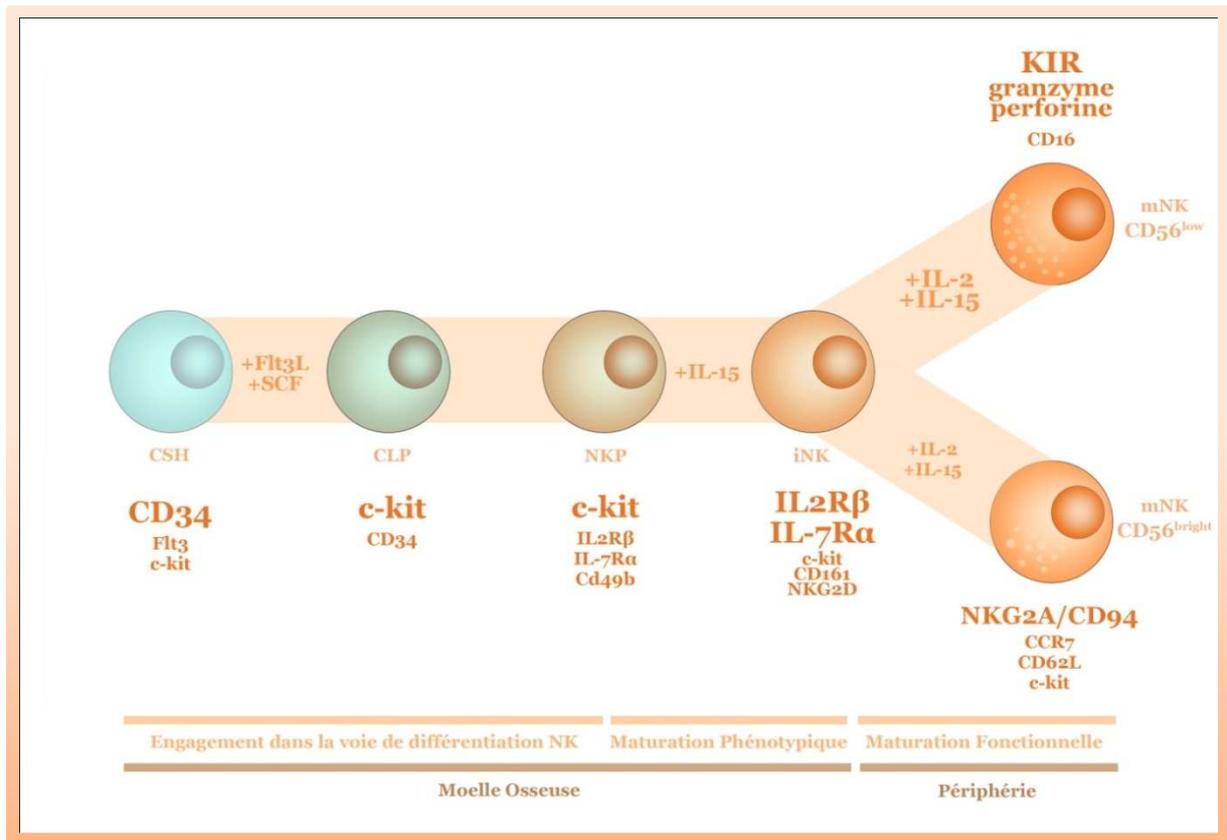
De nombreux FT permettent d'assurer la maturation des lymphocytes NK et leur absence peut engendrer une différenciation aberrante ou incomplète. Les FT Gata-3, IRF-2 et T-bet sont critiques pour l'étape iNK alors que CEBP- $\gamma$ , MEF et MITF gouvernent les fonctions effectrices des NK. Les phénotypes des souris déficientes pour ces différents FT présentent des similarités étonnantes chez les cellules NK issues de la moelle osseuse, suggérant que certains aspects de la différenciation NK sont associés à un réseau de FT (Vosshenrich et al., 2005b).

Chez les populations iNK en développement, Gata-3 et T-bet sont co-exprimés (Townsend et al., 2004) et les observations des modèles KO pour ces FT semblent indiquer une interaction complexe entre ces deux protéines. Gata-3 est requis pour l'expression de CD11b, CD43 et les protéines de la famille Ly49 (Samson et al., 2003). Les NK produits par les souris Gata-3<sup>-/-</sup> ne sont pas affectés dans leurs fonctions cytotoxiques mais leur production d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) est grandement réduite. Cette observation indique que l'acquisition des fonctions NK peut se faire au moins en partie indépendamment de l'expression d'un phénotype NK mature. La faible production d'IFN- $\gamma$  observée est associée à un défaut d'expression de T-bet. Ainsi, Gata-3 apparaît comme un régulateur de l'expression de T-bet. Par conséquent, les souris T-bet KO présentent une faible production d'IFN- $\gamma$  même si elles affichent un phénotype mature normal (Townsend et al., 2004).

De récents modèles ont démontré que les lymphocytes NK déficients pour IRF-2 sont de faibles producteurs d'IFN- $\gamma$ . IRF-2 est nécessaire à l'acquisition du CD11b et CD43 dans la moelle osseuse. Cependant, les NK des souris déficientes, bien que phénotypiquement immatures, présentent des fonctions cytotoxiques normales contre des cibles sensibles (Taki et al., 2005). Par contraste, dans la rate, les NK sont réduits en nombre et sont encore plus immatures avec un phénotype DX5<sup>-</sup> Ly49<sup>-</sup>. Il n'y a pas de NK matures dans la moelle osseuse ni la rate de souris IRF-2 déficientes.

Les FT de maturation agissent très certainement de manière séquentielle. Ceci peut expliquer les phénotypes transitoires observés sur les NK en développement. Par exemple, les étapes précoces de maturation des NK dans la moelle osseuse et le foie sont caractérisées par une expression de TRAIL qui ne persiste pas lorsque les NK rejoignent la rate (Takeda et al., 2005). L'interaction entre Gata-3, IRF-2 et T-bet apparaît complexe. Une hiérarchie possible serait une cascade d'activation Gata-3 puis IRF-2 et enfin T-bet. Gata-3 contrôlerait l'expression de CD11b, CD43 à travers l'expression d'IRF-2 et/ou T-bet.

Les fonctions effectrices des NK phénotypiquement matures sont assurées par un groupe de FT incluant MEF, MITF et CEBP- $\gamma$  (Ito et al., 2001; Kaisho et al., 1999; Lacorazza et al., 2002). Les NK déficients pour ces trois FT se développent normalement mais sont fonctionnellement diminués. Ils présentent une cytotoxicité (diminution de l'expression du granzyme et de la perforine) et une production d'IFN- $\gamma$  réduites. Les données connues sur l'ontogénie des lymphocytes NK chez l'homme sont résumées dans le schéma suivant (Figure 1) :



**Figure 1 - Ontogénie des lymphocytes NK chez l'homme.**

Au cours de la différenciation NK, on peut distinguer 3 étapes clés. (a) l'engagement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) vers la voie des lymphocytes NK. Les CSH perdent leurs propriétés de pluripotence et de prolifération illimitée et acquièrent l'expression de l'IL2Rβ et l'IL7Rα. La réactivité acquise à l'IL-2, l'IL-7 puis enfin à l'IL-15 permet de poursuivre la différenciation en NK immature. (b) la maturation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes NK. Au cours de cette étape, les lymphocytes NK ont acquis certains récepteurs activateurs (CD161, NKG2D) et expriment plus intensément les récepteurs à l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15. (c) l'homéostasie des lymphocytes NK en périphérie. La stimulation prolongée à l'IL-2 et l'IL-15 permet de faire évoluer les lymphocytes NK vers les deux sous-populations NK décrites (CD56<sup>low</sup> et CD56<sup>bright</sup>). Les étapes (a) et (b) ont lieu majoritairement dans la MO alors que l'étape (c) peut avoir lieu dans la MO mais aussi les organes périphériques (GL, rate).

#### 1.2.4 SOUS POPULATIONS DE NK MATURES

Chez l'homme, Les NK matures sont caractérisés par l'absence du marqueur CD3 et l'expression des marqueurs CD56, CD8, FcγRIII/CD16 (Cooper et al., 2001). La majorité des

NK (90% environ) exprime faiblement le marqueur CD56 (CD56<sup>low</sup>) et fortement le récepteur FcγRIII/CD16. Le reste des NK est CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low</sup> ou CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> (Figure 2).

Les deux sous populations diffèrent quant à l'expression des récepteurs KIR, l'hétérodimère CD94/NKG2A et ILT-2. Les NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low</sup> expriment fortement le CD94/NKG2A mais ne présentent que très peu de KIR et ILT-2 alors que l'on constate l'inverse pour la sous population CD56<sup>low</sup>CD16. Il ne semble pas y avoir de différences dans l'expression des récepteurs naturels de cytotoxicité (NCR) ni dans l'expression de NKG2D (Sivori et al., 2000b).

Les NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> expriment le récepteur hétéro-trimérique de forte affinité à l'IL-2 (IL-2Rαβγ) ainsi que c-kit ce qui assure une très forte réponse proliférative après traitement à l'IL-2. Ceci n'est pas le cas des NK CD56<sup>low</sup>CD16 qui n'expriment que le récepteur intermédiaire IL-2Rβγ, qui sont c-kit<sup>-</sup> et ne présentent que peu de réponse à l'IL-2 *in vitro* (Baume et al., 1992). Les deux sous types de cellules NK expriment constitutivement les récepteurs à l'IL-1, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 et IL-21 mais à des taux différents.

L'expression des molécules d'adhérence, des chimiokines, et des récepteurs membranaires des deux sous-groupes de lymphocytes NK est révélatrice de leur localisation *in vivo* (Campbell et al., 2001). Ainsi, les CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> expriment CC-chemokine receptor 7 (CCR7), CXC-chemokine receptor 3 (CXCR3) et la L-selectine (CD62L), des molécules généralement impliquées dans la localisation des lymphocytes T au niveau des GL. Par opposition, les NK CD56<sup>low</sup>CD16 n'expriment pas CCR7 mais présentent très fortement leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1), CXCR1 et CX3C-chemokine receptor 1 (CX3CR1). Ils montrent également une réponse à CX3CL1 et à l'IL-8, ce qui les prédispose à une localisation au niveau des sites inflammatoires.

Les différences phénotypiques de ces deux sous populations leur attribuent des rôles complémentaires au sein de l'organisme. Les  $CD56^{dim}CD16$  sont plus cytotoxiques et expriment de plus importants niveaux de granzyme et perforine (Nagler et al., 1989). De plus, l'expression du CD16 permet une cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC) qui prédestine les  $CD56^{low}CD16$  à une fonction cytotoxique dans la réponse immunitaire. Les  $CD56^{bright}CD16$  représentent la principale source de cytokines immuno-régulatrices comme l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , la LT, l'IL-10, l'IL-13 et le GM-CSF. La production de cytokines de la sous population  $CD56^{low}CD16$  semble négligeable en comparaison. Ces données indiquent que les NK  $CD56^{bright}CD16$  seraient les premiers fournisseurs de cytokines inflammatoires pour les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les macrophages. Leur fonction majeure serait donc la création d'une boucle d'amplification pro-inflammatoire rapide. La forte sensibilité de cette sous population à l'IL-2 et sa localisation préférentielle au sein des GL indiquent un rôle dans l'activation des lymphocytes T au niveau des structures immunes secondaires.

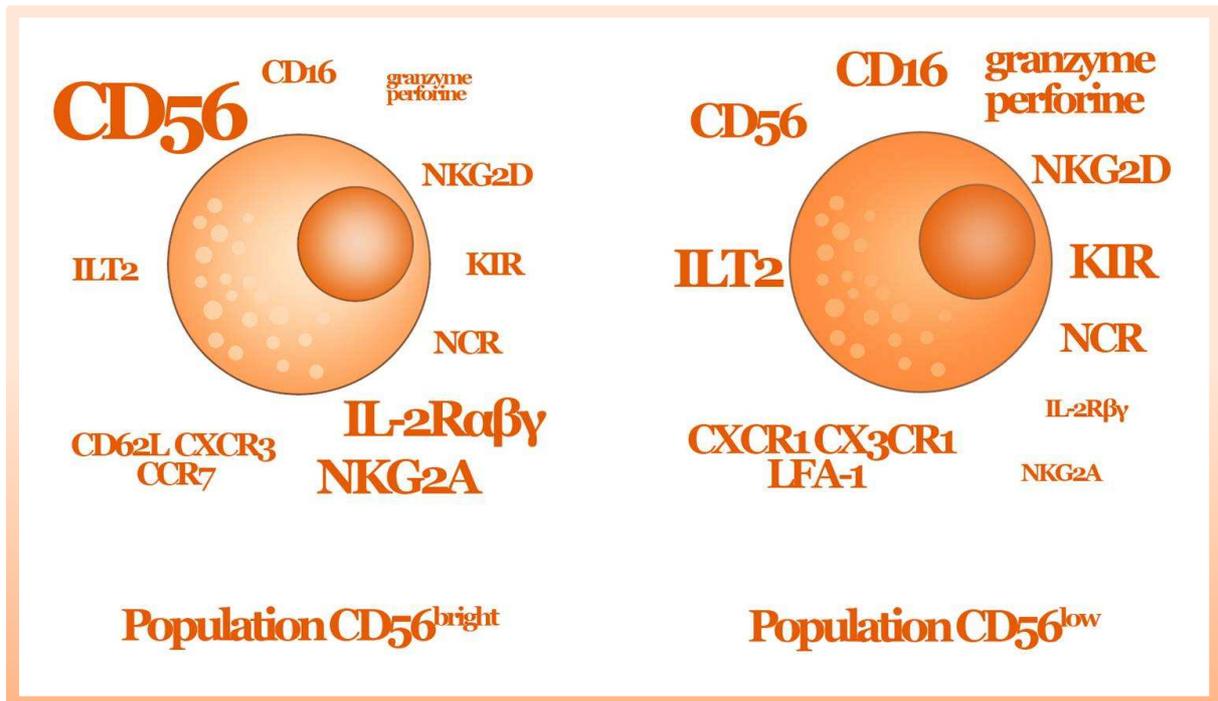


Figure 2 - Les deux sous-populations de lymphocytes NK chez l'homme.

Les lymphocytes NK CD56<sup>low</sup> CD16<sup>+</sup> représentent la majorité des lymphocytes NK circulants (90% des lymphocytes NK totaux). Ils présentent un phénotype cytotoxique avec des récepteurs aux chimiokines inflammatoires (CXCR1/CX3CR1), une expression élevée des NCR, des KIR et des granzymes/perforines. En ce qui concerne les lymphocytes NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, ils sont localisés principalement dans les organes lymphoïdes secondaires et jouent un rôle immuno-régulateur via la production de nombreuses cytokines.

A noter que si les NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> sont peu représentés dans les organes et dans le sang circulant, ils représentent la sous population majeure dans l'utérus de la femme enceinte et jouent un rôle prépondérant dans la tolérance entre la mère et le fœtus. Après recrutement suite à l'ovulation, leur nombre augmente fortement et est maintenu à un taux élevé (Kitaya, 2008). Pourtant si ces NK utérins partagent un phénotype proche des populations CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires, ils ne leur sont pas identiques. Ils expriment le CD9, le CD103 et disposent d'une plus grande quantité de récepteurs KIR. Ces trois protéines sont induites après une stimulation par le TGF-β1 (Keskin et al., 2007) ce qui semble être une conséquence directe de l'environnement tolérogène unique

existant dans l'utérus de la femme enceinte. Les NK utérins peuvent être divisés en deux groupes : les NK endometriaux (eNK) et les NK déciduaux (dNK) qui au cours des dernières années ont montré des distinctions fonctionnelles caractéristiques. Ainsi, les eNK se localisent au niveau de l'endomètre et présentent de faibles capacités cytotoxiques (Jones et al., 1997). Ils n'expriment pas le NKp30 et nécessitent une stimulation via l'IL-2 ou l'IL-15 pour être actifs et fonctionnels (Kitaya et al., 2000). Cette activation leur fait acquérir un phénotype proche des dNK, ce qui laisse penser que les eNK pourraient être des progéniteurs pour les dNK (Manaster et al., 2008). Les dNK surexpriment le granzyme A, NKG2C et NKG2E (Koopman et al., 2003). Ils jouent un rôle majeur dans la protection des cellules trophoblastiques et des blastocytes et permettent un développement structurel des vaisseaux sanguins et de la muqueuse utérine grâce à leur production de facteurs angiogéniques (Vascular Endothelial Growth Factor ; VEGF, Placenta Growth Factor : PLGF) (Hanna et al., 2006). L'ensemble de ces données suggère un rôle important et complémentaire des uNK à l'interface entre l'enfant et la femme enceinte.

Chez la souris, les NK matures expriment la combinaison de marqueurs  $CD161^+CD122^+NK1.1^+CD49b^+NKG2D^+CD16^+CD94/NKG2A/C^+$   $CD11b^+CD43^+$  et présentent une expression variable des récepteurs Ly49. Il n'y a que très peu de données sur l'existence de sous populations NK fonctionnellement différentes chez le rongeur. Il a été démontré que seule une fraction des NK spléniques exprime le CD107a (un marqueur de l'exocytose des granules cytotoxiques) ou encore secrètent de l'IFN- $\gamma$  après stimulation, renforçant le concept d'une population fonctionnellement hétérogène à identifier chez la souris (Bryceson et al., 2005). Plus récemment, le marqueur CD27 a été avancé comme marqueur permettant de subdiviser la population NK murine (Hayakawa and Smyth, 2006a). Sur la base du CD27 et du CD11b, les auteurs ont proposé un modèle possédant 3 sous-groupes cellulaires : les NK  $CD11b^{low}CD27^+$ ,  $CD11b^{bright}CD27^+$  et  $CD11b^{bright}CD27^-$ . La

population CD11b<sup>bright</sup> CD27<sup>-</sup> exprime plus de récepteurs Ly49 et ne présente pas la chimiokine CXCR3 qui est fortement exprimée par la population CD11b<sup>bright</sup> CD27<sup>+</sup>. Les NK CD11b<sup>low</sup> CD27<sup>+</sup> sont une population produisant de grandes quantités de cytokines alors que la population CD11b<sup>bright</sup> CD27<sup>+</sup> est plus cytotoxique et réagit fortement aux stimulations par les NKG2DL. Une analogie entre les populations CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> et CD27<sup>bright</sup> d'une part et CD56<sup>low</sup> CD16 et CD27<sup>low</sup> d'autre part est possible, tant leurs fonctions sont similaires à celles observées pour les sous-populations NK humaines. Cette étude fournit les premières preuves d'une subdivision cellulaire au sein de la population NK murine qu'il serait intéressant d'approfondir et de confronter aux connaissances dans le modèle humain.

### 1.2.5 HOMEOSTASIE DES LYMPHOCYTES NK

Au terme de leur maturation, les lymphocytes NK sont retrouvés dans le sang, la moelle osseuse, la rate, le foie, les GL, les poumons, l'omentum et dans l'utérus de la femme enceinte. Le contrôle de la population NK est réalisé par des mécanismes intracellulaires comme les FT mais aussi des signaux extracellulaires comme l'IL-15 et le Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1 (Laouar et al., 2005; Ranson et al., 2003). Une balance doit s'établir entre survie, prolifération et mort cellulaire pour garantir une population NK efficace au cours d'une réponse immunitaire.

L'IL-15 joue un rôle majeur dans l'homéostasie NK. Cette interleukine soutient la survie et favorise la prolifération des NK matures. Cet effet est la conséquence d'une expression accrue de la protéine anti-apoptotique bcl-2 qui peut prévenir la mort par apoptose. Les lymphocytes NK matures ne survivent pas lorsqu'ils sont transférés dans une souris déficiente pour IL-15R $\alpha$  suggérant un rôle des cellules environnantes les NK dans leur homéostasie (Koka et al., 2003). Ainsi, l'existence d'une interaction complexe entre l'IL-15/IL-15R $\alpha$  d'une part et le CD122 et la chaîne de récepteur aux cytokines  $\gamma_c$  d'autre part a été démontrée (Dubois et al.,

2002). Cette trans-présentation aurait lieu dans des niches spécifiques riches en IL-15 où les NK résident pour survivre et proliférer. La localisation exacte et le contexte au cours duquel l'IL-15 joue son rôle sont peu connus.

Les FT IRF-2 et T-bet sont impliqués dans la protection contre l'apoptose des NK matures. En effet, les souris déficientes en ces FT ont une population NK circulante réduite (Taki et al., 2005). Pourtant, cet effet ne semble pas dépendre d'une absence de réponse à l'IL-15. Une hypothèse implique l'existence d'un signal interférant avec l'activation puisque les souris déficientes en IRF-2 expriment de forts taux de CD69.

Une régulation négative existe aussi pour contrôler la population NK via le TGF- $\beta$ 1. Cette cytokine est un puissant inhibiteur de la prolifération NK (Schmidt-Weber and Blaser, 2004). En effet, l'absence de TGF- $\beta$ 1 se caractérise par un syndrome inflammatoire généralisé avec de nombreux infiltrats lymphocytaires (Kulkarni et al., 1993). Une étude plus récente confirme l'implication du TGF- $\beta$ 1 dans l'homéostasie NK chez la souris (Laouar et al., 2005). Lorsqu'une forme dominante négative tronquée du récepteur au TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ RII, est exprimée spécifiquement par les lymphocytes NK via une dépendance au promoteur du CD11c, il en résulte une forte expansion et activation des lymphocytes NK de la rate. Bien que la maturation des lymphocytes NK soit normale, la population NK périphérique est établie plus rapidement. Chez l'homme, les lymphocytes NK sont aussi sensibles au TGF- $\beta$ 1. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) utilisent des mécanismes suppresseurs de prolifération dépendants du TGF- $\beta$ 1 pour le contrôle des populations lymphocytaires T (von Boehmer, 2005) et il semble possible qu'ils puissent agir comme médiateurs de l'homéostasie NK. Premièrement, des données murines de délétions de T régulateurs *in vivo* démontrent qu'au niveau des ganglions lymphatiques, les Treg sont capables de prévenir la production de CCR5, limitant le recrutement des DC sur le site. Deuxièmement, les Treg agissent en tant

qu'inhibiteurs de l'expression de l'IL-15 $\alpha$  sur les DC. Cette action réprime toute activation croisée des NK par présentation membranaire de l'IL-15 par l'IL-15 $\alpha$  (Terme et al., 2008). Les Treg apparaissent donc comme un élément régulateur important de l'auto-réactivité NK.

Contrairement aux lymphocytes T et B, les cellules NK ne présentent pas à priori de mémoire à long terme. Pourtant, des études récentes indiquent que les lymphocytes NK posséderaient une mémoire immunitaire limitée (Cooper et al., 2009; Sun et al., 2009). En effet, lors d'études réalisées sur l'infection au CMV murin, Sun et al. ont pu observer l'expansion « clonal » (d'un facteur 10<sup>3</sup>) et la persistance d'une population NK spécifique (Ly49H<sup>+</sup>, ligand de la protéine virale m157). Par la suite, des expériences de transfert adoptif ont confirmé le rôle protecteur de ces cellules. Enfin, la persistance de cette population est bien plus courte que celle d'une population T mémoire (quelques semaines contre des années) mais laisse entrevoir une proximité inattendue entre les lymphocytes T et les lymphocytes NK.

La production d'une population cellulaire possédant tout les éléments (granules cytotoxiques, production de cytokines pro-inflammatoires) pour une réponse rapide et notable à l'intrusion de pathogène dans l'organisme n'est pas sans danger pour l'hôte. Les lymphocytes NK se doivent de respecter l'intégrité du corps et des tissus dans lesquels ils évoluent et les modalités de régulation physiologiques de ces cellules ont été décrites par Karre et al. à la fin des années 80 (Karre et al., 1986).

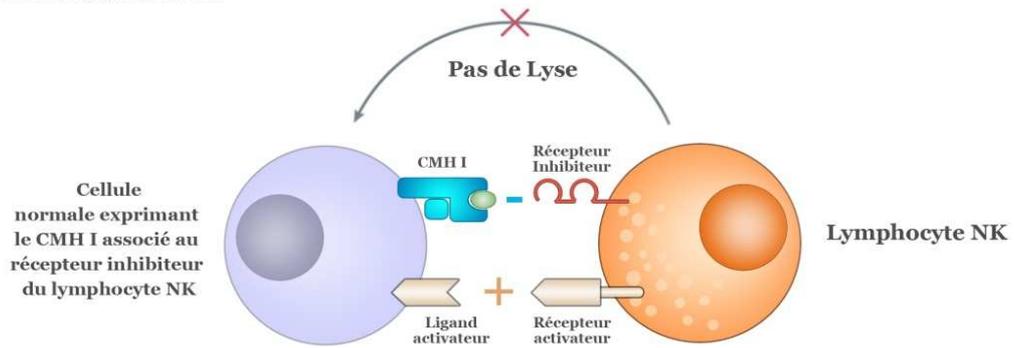
---

### 1.3 LA THEORIE DU « MISSING-SELF »

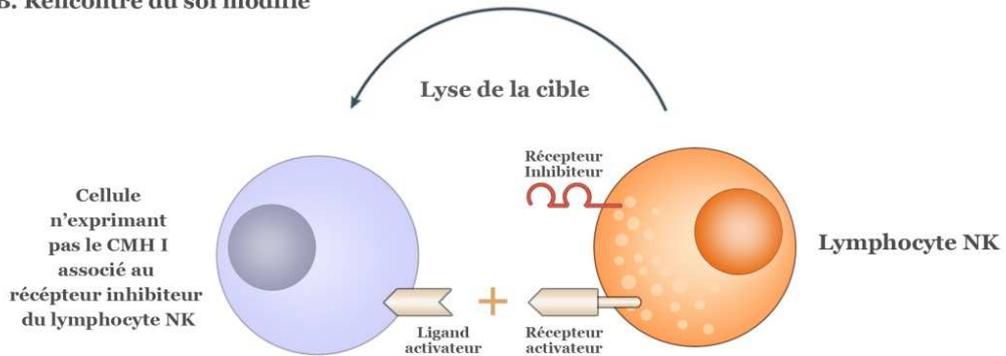
Bien que décrites initialement comme étant des cellules non restreintes par le CMH par opposition aux lymphocytes T, les NK disposent d'un mécanisme de régulation unique et dépendant du CMH I. Kärre et coll. ont remarqué que les lymphocytes NK étaient fortement inhibés après leur contact avec des cellules tumorales exprimant le CMH I (Karre et al.,

1986). La démonstration fut complétée lorsqu'ils observèrent le rejet des cellules hématopoïétiques dans un modèle de greffe syngénique de MO issue de souris déficientes pour la  $\beta_2$ -microglobuline ( $\beta_2$ -m) dans des souris des souches sauvages (Bix et al., 1991). Ainsi, la théorie du « missing-self » fournit les conditions d'activation conditionnelles des NK (Figure 3). D'après cette théorie, les cellules NK assurent une surveillance et une destruction des cellules qui présentent une perte de l'expression du CMH I, un phénomène souvent observé dans un contexte de transformation cellulaire ou au cours d'une infection virale ou bactérienne. Cette notion fut modifiée ultérieurement pour refléter les connaissances obtenues sur les lymphocytes NK. En effet, l'activation des lymphocytes NK dépend plus précisément d'une balance entre des signaux inhibiteurs et des signaux activateurs intégrés lors du contact cellulaire et la formation d'une synapse immunologique (SI) entre le lymphocyte NK et sa cible. Le lymphocyte NK utilise alors les récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH I comme un signal de contrôle plus que d'abrogation totale de leur fonction. Par conséquent, l'activation du lymphocyte NK est non seulement conditionnée par une faiblesse des signaux inhibiteurs mais aussi la présence de signaux activateurs transmis entre autre par leurs récepteurs activateurs comme les NCR. Dans certains modèles tumoraux, la présence d'un signal activateur fort peut même outrepasser l'inhibition fournie par le CMH I même si cela est rare (Cerwenka et al., 2001). Par conséquent, un échec de la fonction NK peut tout aussi bien être du à un signal inhibiteur fort ou un signal activateur insuffisant à induire une réponse cytotoxique. Enfin, la dernière condition permettant l'activation du lymphocyte NK la condition d'alloréactivité NK. Cette configuration particulière se retrouve dans les protocoles de greffes haplo-identiques (Velardi et al., 2009). Dans ces thérapies cellulaires, le patient reçoit de la MO d'un donneur présentant un mésappariement entre les récepteurs inhibiteurs NK du donneur et ces propres molécules de CMH I. Le lymphocyte NK est activé puisque il ne retrouve pas le CMH I requis pour réprimer ces fonctions.

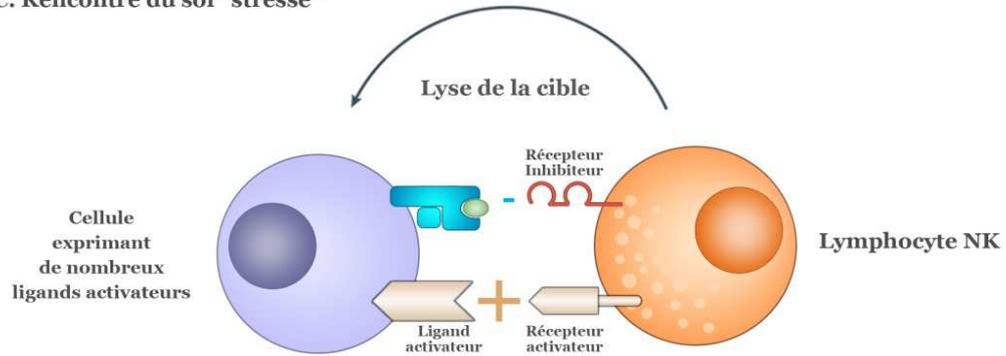
**A. Rencontre du soi**



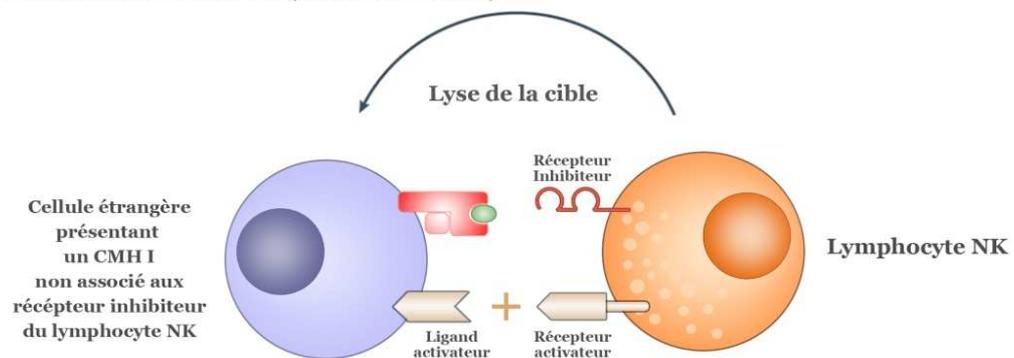
**B. Rencontre du soi modifié**



**C. Rencontre du soi "stressé"**



**D. Rencontre du non-soi (alloréactivité NK)**



### Figure 3 - Théorie du « Missing-self ».

Les lymphocytes NK assurent en permanence une surveillance de l'organisme. A. Lorsque le lymphocyte NK rencontre une cellule mononucléée saine de l'organisme (exprimant le CMH I) le récepteur inhibiteur du lymphocyte NK est engagé par le CMH I et initie un signal répresseur fort sur le lymphocyte NK. Ce signal prévient toute activation potentielle perçue d'autre part via les récepteurs activateurs du lymphocyte NK. Il n'y a pas de lyse de la cellule cible. B. Si le lymphocyte NK rencontre une cellule n'exprimant pas le CMH I, ce qui peut être le cas de cellules infectées par un virus ou une bactérie ou encore les cellules en transformation, il ne perçoit aucun signal inhibiteur prévenant son activation. Si le lymphocyte NK reçoit un signal activateur fort d'autre part, il peut s'activer fortement. Il y a dans ce cas lyse de la cellule cible. C. Si le lymphocyte NK rencontre une cellule exprimant une grande quantité de ligand activateur e.g. lors d'une transformation tumorale ou d'un stress oncogénique important, la cellule cible peut tout de même être lysée et le signal activateur peut outrepasser l'inhibition fournie par les récepteurs inhibiteurs NK. D. Lorsque un lymphocyte NK rencontre une cellule du non-soi et présentant un mésappariement entre son CMH I exprimé et la réactivité de ces récepteurs inhibiteurs, il peut s'activer à l'encontre de la cellule pour la détruire.

---

## 1.4 RECEPTEURS DES LYMPHOCYTES NK

Les mécanismes de reconnaissance des lymphocytes NK aboutissant aux différentes voies d'activation et d'inhibition citées sont bien plus complexes que ceux gouvernant les fonctions des lymphocytes T ou B. Alors que ces derniers s'appuient principalement sur le TCR ou le BCR pour réguler leur activation, les lymphocytes NK requièrent l'intégration de nombreux signaux provenant des multiples ligands auxquels ils sont sensibles. Ces ligands seront ici classés en trois groupes principaux : (1) Les récepteurs spécifiques du CMH I classique, (2) les récepteurs spécifiques du CMH I non classique et (3) les récepteurs spécifiques de molécules n'appartenant pas au CMH I.

---

### 1.4.1 RECEPTEURS SPECIFIQUES DU CMH I CLASSIQUE

Ces récepteurs NK perçoivent l'expression aberrante des molécules classiques et non-classiques du CMH I. Les gènes correspondants sont situés au sein du chromosome 19 et comprennent les récepteurs Ly49 chez la souris, les récepteurs KIR et ILT chez l'homme et la famille de récepteurs CD94/NKG2 présents chez les deux espèces.

#### 1.4.1.1 RECEPTEURS Ly49

---

Le nombre de gènes codant pour les récepteurs de la famille Ly49 varient en fonction des souches de souris et un important polymorphisme a été mis en évidence (Mehta et al., 2001). Quatorze gènes Ly49 ont été identifiés dans un cluster au niveau du chromosome 6 (Yokoyama and Plougastel, 2003). Ly49A est le récepteur caractéristique de cette famille de glycoprotéine C-lectine transmembranaire de type II présentée à la surface cellulaire sous la forme d'homodimère. La plupart des récepteurs Ly49 possède des séquences ITIM dans leur domaine intracellulaire pour exercer leurs fonctions répressives bien qu'il existe des récepteurs Ly49 (Ly49D et Ly49H chez la souris C57BL/6) qui s'associent avec DAP12 pour

assurer des fonctions activatrices (Smith et al., 1998). Ce sont les récepteurs inhibiteurs Ly49 qui sont prédominants dans le contrôle des fonctions NK chez la souris lors de leurs interactions avec les molécules du CMH I. Ainsi, de nombreuses données sur la régulation de l'expression des récepteurs Ly49 ont été publiées ces dernières années. Chaque lymphocyte NK peut transcrire et exprimer entre 1 et 4 gènes Ly49 ce qui définit une population hétérogène au sein des NK matures totaux (Kubota et al., 1999). Cette expression peut être mono-allélique grâce à un mécanisme de régulation stochastique spécifique (Held and Raulet, 1997; Saleh et al., 2004). Enfin, comme il a été décrit précédemment, la fréquence et le taux d'expression de chaque récepteur Ly49 sur un NK donné est finement régulé par les molécules de CMH H-2 présentes chez la souris au cours du « licensing » du lymphocyte NK (Raulet et al., 2001). En marge des récepteurs inhibiteurs, certains récepteurs Ly49 (D et H par exemple) présentent des fonctions activatrices. Cependant l'affinité des Ly49 activateurs pour les ligands du CMH H2 est bien plus faible que celle des récepteurs Ly49 inhibiteurs. La compétition pour la fixation est donc favorable aux Ly49 inhibiteurs et par conséquent, les fonctions exactes de ces récepteurs semblent confuses. L'interaction entre Ly49D et H2-D<sup>d</sup> a été démontrée et semble être impliquée dans le rejet de MO allogénique chez des souris C57BL/6 (George et al., 1999). D'autre part, la stimulation de Ly49D par son ligand permet de potentialiser les fonctions cytotoxiques NK et la sécrétion de chimiokines. Pourtant, si le rôle de ces molécules Ly49 activatrices est décrit dans les contextes de greffes de MO, leur rôle dans une réponse immunitaire physiologique n'est pas encore connu. Il est possible que les ligands de forte affinité pour les Ly49 activateurs ne soient pas les protéines du soi, qui dans ce cas représenteraient plus une réactivité croisée non souhaitée. Cela est le cas pour Ly49H qui n'a aucune affinité pour les molécules H-2. Cependant, Ly49H peut interagir fortement avec la protéine virale m157 encodée par le MCMV et exprimée à la surface des

cellules infectées (Arase et al., 2002). Des études complémentaires seront nécessaires pour élucider le rôle de ces protéines Ly49 activatrices.

#### 1.4.1.2 RECEPTEURS KIR

Chez l'homme, la famille des KIR présente d'étonnantes similarités et un fonctionnement proche de la famille Ly49 chez la souris. Cette famille est composée de 15 gènes et 2 pseudo-gènes localisés sur le chromosome 19q13.4 (Tableau 1).

**Tableau 1 - Récepteurs KIR et leurs ligands.**

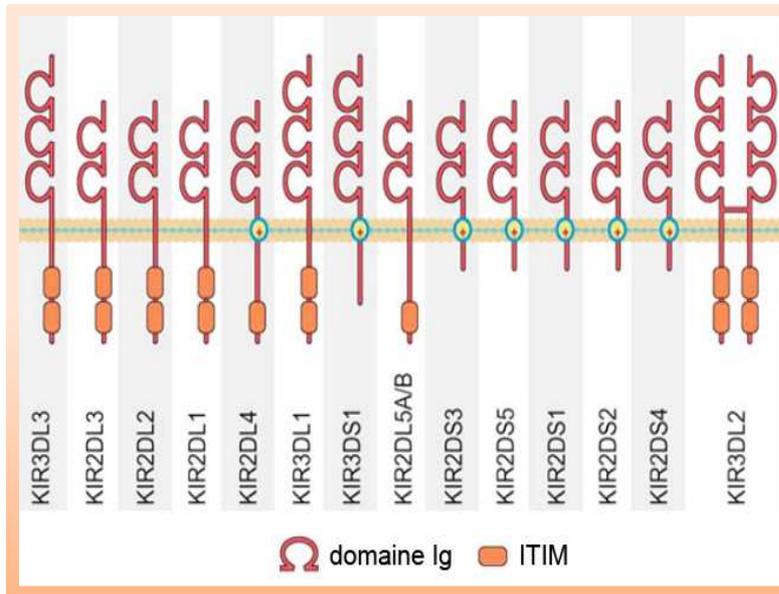
\*Gènes partagés par tous les haplotypes KIR.

Gène	CD	Fonction	Signalisation	Ligand
<b>KIR3DL3*</b>	CD158z	Inhibition	ITIM	?
<b>KIR2DL3</b>	CD158b2	Inhibition	ITIM	HLA-C Groupe 1
<b>KIR2DL2</b>	CD158b1	Inhibition	ITIM	HLA-C Groupe 1
<b>KIR2DL1</b>	CD158a	Inhibition	ITIM	HLA-C Groupe 2
<b>KIR2DL4*</b>	CD158d	Inhibition/Activation ?	ITIM ? FcεRIγ ?	HLA-G ?
<b>KIR3DL1</b>	CD158e1	Inhibition	ITIM	HLA-Bw4
<b>KIR3DS1</b>	CD158e2	Activation	DAP12	?
<b>KIR2DL5A</b>	CD158f	Inhibition	ITIM	?
<b>KIR2DL5B</b>		Inhibition	ITIM	?
<b>KIR2DS3</b>		Activation	DAP12	?
<b>KIR2DS5</b>	CD158g	Activation	DAP12	?
<b>KIR2DS1</b>	CD158h	Activation	DAP12	HLA-C, faible.
<b>KIR2DS2</b>	CD158j	Activation	DAP12	?
<b>KIR2DS4</b>	CD158i	Activation	DAP12	HLA-A11, HLA-C
<b>KIR3DL2*</b>	CD158k	Inhibition	ITIM	HLA-B27

La distribution et le nombre de gènes KIR exprimés pour chaque individu sont différents. Initialement, deux haplotypes communs, nommés A et B ont été définis en fonction des gènes présents et des polymorphismes alléliques de chaque loci (Uhrberg et al., 1997). A ce jour, on ne dénote pas moins de 37 haplotypes différents. Si les haplotypes A ne possèdent que de 5 à 7 gènes, les haplotypes B peuvent contenir jusqu'à 10 gènes différents. Seuls 3 gènes sont partagés par tous les haplotypes (KIR3DL3, KIR2DL4, KIR3DL2) (Hsu et al., 2002). Les gènes des KIR, une fois exprimés et régulés par le « licensing » sont maintenus dans chaque cellule NK.

Les récepteurs KIR font partis de la superfamille des Immunoglobulines (Ig) et par conséquent sont de glycoprotéines transmembranaires de type I avec deux ou trois domaines Ig-like (désigné KIR2D ou KIR3D) dans la partie extracellulaire (Colonna and Samaridis, 1995). La partie intracytoplasmique peut varier en taille, certains récepteurs possèdent une longue queue cytoplasmique (L) avec une ou deux séquences « Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif » (ITIM) alors que certains récepteurs ont un petit domaine cytoplasmique (S) sans ITIM. Les KIR possédant une région intracellulaire courte ont un résidu lysine localisé au centre de leur région transmembranaire qui leur permet de s'associer avec DAP12 et donc signaler grâce à des séquences « Immunoreceptor tyrosine-based activation motif » (ITAM) présentes dans la partie intracellulaire du co-récepteur (Olcese et al., 1997) (Figure 4). Le rôle de cette association est peu connu mais des données récentes indiquent que ces KIR activateurs pourraient jouer un rôle dans l'éducation des lymphocytes NK (Fauriat et al., 2009). Après fixation à leurs ligands, les KIR recrutent la protéine SH2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-1) grâce à leurs séquences ITIM phosphorylées

et répriment les fonctions des NK les exprimant par une cascade de signalisation décrite précédemment.



**Figure 4 - Structures des récepteurs KIR.**

Les variations au niveau de la structure se situent dans le nombre de domaine Ig (2 ou 3, KIR2 ou KIR3) et le nombre de séquences ITIM en intracellulaire. Les KIR possédant un domaine intracellulaire court (les KIR activateurs (S)) s'associent à DAP12 via des résidus transmembranaires pour pouvoir signaler dans la cellule. (Adapté de (Lanier, 2005).

Les KIR reconnaissent les protéines des groupes HLA-A, HLA-B et HLA-C. Un trimère HLA-I complet composé d'une chaîne lourde, de la  $\beta$ 2-microglobuline et d'un peptide est nécessaire à la reconnaissance des KIR (Hansasuta et al., 2004). Bien que les KIR nécessitent un peptide pour la reconnaissance du CMH I, ils ne distinguent pas les peptides du soi ou du non-soi. En outre, les KIR peuvent discriminer différents peptides présentés par les HLA-A, HLA-B et HLA-C et les résidus en position 7 et 8 semblent les plus importants dans cette discrimination (Hansasuta et al., 2004). Les membres de la sous famille KIR2DL reconnaissent un polymorphisme chez les protéines HLA-C à la position 77 et 80 du domaine  $\alpha$ 1 de la chaîne lourde de HLA-C (Colonna et al., 1992). Les deux polymorphismes connus pour ces positions sont Ser (77)/Asn (80) (HLA-C Groupe 1) ou Asn(77)/Lys(80) (HLA-C Groupe 2) et ceux-ci sont reconnus par différentes isoformes de KIR2DL. KIR3DL1 réagit avec HLA-B et certaines protéines du HLA-A possédant le marqueur sérologique Bw4, défini

par les résidus 77-83 dans le domaine  $\alpha 1$  (Gumperz et al., 1997). KIR3DL2 reconnaît certaines isoformes du HLA-A même si à ce jour la spécificité des récepteurs n'est pas définie (Dohring et al., 1996).

Si la spécificité des KIR inhibiteurs a fait l'objet de nombreuses études, très peu de travaux caractérisent les KIR activateurs. Dans les études réalisées, il a été démontré que les KIR activateurs possédaient une affinité nulle ou bien plus faible que leurs correspondants inhibiteurs. Ainsi, l'interaction entre KIR2DL1 et HLA-C est bien plus forte que celle entre KIR2DS1 et HLA-C alors que leurs domaines extracellulaires ne diffèrent que de 7 acides aminés et il en est de même pour les autres membres activateurs (Katz et al., 2001; Vales-Gomez et al., 1998; Winter et al., 1998). Cette faible affinité pourrait résulter d'une évolution des récepteurs visant à diminuer les risques d'auto-immunité. En effet, des données épidémiologiques ont montré que les individus exprimant le gène KIR2DS2 et certains allèles HLA-C seraient prédisposés au développement d'arthrite rhumatoïde avec complications vasculaires (Yen et al., 2001). Le même type d'observations a été relaté dans le cadre d'arthrite psoriasique (Martin et al., 2002). Par ailleurs, les KIR activateurs semblent bénéfiques pour les patients atteints de certaines infections virales. Citons comme exemple, la corrélation entre une meilleure survie et l'expression des gènes HLA-Bw4 et KIR3DS1 pour les individus atteints du SIDA (Flores-Villanueva et al., 2001). De même, l'absence d'expression KIR2DS2 est corrélée à une moindre efficacité de certains traitement chez les patients transplantés du rein et atteints d'infections récurrentes à l'hépatite C (Askar et al., 2009).

#### 1.4.1.3 RECEPTEURS CD94/NKG2

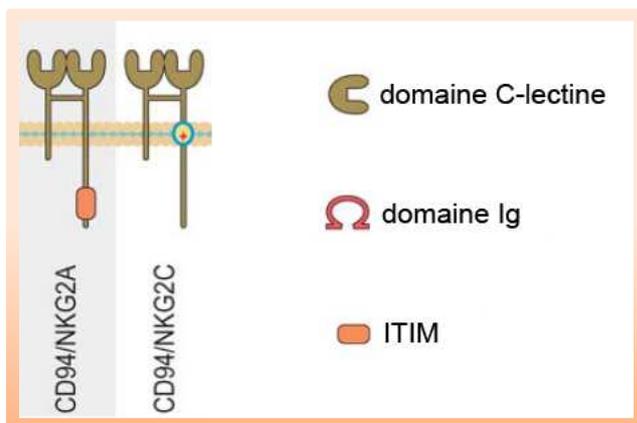
---

Les gènes de la famille CD94 et Natural Killer Group 2 (NKG2) sont présents dans les génomes humain (Houchins et al., 1991) et murin (Vance et al., 1998). Ils sont localisés chez

l'homme sur le chromosome 12p12.3-p13.2 et sur le chromosome 6 chez la souris. Le gène CD94 est proche de 4 gènes de la famille NKG2 (NKG2A, -C, -E, -F) chez l'homme (Houchins et al., 1991) et 3 gènes chez la souris (NKG2A, -C, -E). Le polymorphisme de ces gènes est faible en comparaison des gènes KIR et de Ly49 et les variations alléliques n'affectent que très peu les fonctions de ces récepteurs (Shum et al., 2002). Certains membres ont une fonction inhibitrice (NKG2A) et d'autres présentent des propriétés activatrices (NKG2C, -E, -F). Les membres inhibiteurs semblent posséder une plus forte affinité que leurs équivalents activateurs pour leurs ligands communs comme cela est le cas pour les KIR ou Ly49 (Vales-Gomez et al., 1999). CD94/NKG2A et CD94/NKG2C reconnaissent des molécules du CMH I non classique, HLA-E chez l'homme et Qa1<sup>b</sup> chez la souris. Les molécules HLA-E et Qa1<sup>b</sup> ont la particularité de présenter des peptides issus de la dégradation de la séquence signal des autres molécules du CMH I (Davies et al., 2003; Miller et al., 2003). CD94/NKG2A peut donc contrôler le statut des CMH I classiques et non classiques (HLA-G) exprimés par une cellule et percevoir un dysfonctionnement cellulaire. Des mécanismes de contournement de cette voie de régulation sont possibles. Ainsi, le peptide UL40 issu du HCMV peut s'associer au HLA-E (Wang et al., 2002) et favoriser une inhibition des lymphocytes NK suite à l'infection virale.

CD94 et NKG2 encodent pour des protéines transmembranaires de type II de la famille des C-lectine. CD94 est exprimé à la surface de la cellule associé par un pont disulfure à une autre molécule de CD94 pour former un homodimère ou à une molécule de NKG2A pour former un hétérodimère. Cette association est nécessaire à la présentation membranaire du récepteur NKG2A qui possède les séquences ITIM requises pour la signalisation intracellulaire de ces récepteurs inhibiteurs (Le Drean et al., 1998) (Figure 5). Le couple CD94/NKG2C forme un hétérodimère qui nécessite une association avec DAP12 pour une expression stable à la membrane (Lanier et al., 1998a). Aucune étude n'a pu démontrer une association de NKG2E

avec DAP12 et NKG2F ne possède aucun domaine transmembranaire. Ceci étant du à la présence d'un codon stop prématuré dans la séquence génomique. Par conséquent, NKG2E et NKG2F ne seront pas décrits ici. Chez la souris, CD94/NKG2C et CD94/NKG2E sont tous deux associés à DAP12 (Vance et al., 1999). CD94/NKG2A et CD94/NKG2C sont exprimés par plusieurs sous-populations de manière stochastique et par conséquent ne semblent pas définir une sous population particulière.



**Figure 5 - Structure des récepteurs NKG2 humain.**

Le couple NKG2A/CD94 peut signaler par lui-même grâce à la présence d'une séquence ITIM dans la partie intracellulaire de NKG2A. Pour le couple CD94/NKG2C, l'association avec une chaîne DAP12 est nécessaire pour la transduction du signal. (Adapté de (Lanier, 2005).

Comme c'est le cas pour les protéines KIR et Ly49, CD94/NKG2C reconnaît le même ligand que CD94/NKG2A mais avec une plus faible affinité (Vales-Gomez et al., 1999). Certaines études récentes permettent de mettre en avant le rôle potentiel des NKG2 activateurs. Michaelsson et coll. ont montré que les peptides dérivés de la protéine de choc thermique 60 (hsp60) se fixaient à HLA-E. Pourtant, ces couples de molécules HLA-E/peptide ne peuvent pas s'associer au récepteur CD94/NKG2A la reconnaissance par les récepteurs de type CD94/NKG2C est nécessaire. Les cellules stressées seraient donc reconnues par les cellules NK et rapidement éliminées (Michaelsson et al., 2002). Il est aussi possible que certains peptides issus de pathogènes puissent préférentiellement fixer la molécule CD94/NKG2C et signaler l'instabilité des cellules infectées par cette voie.

#### 1.4.1.4 RECEPTEURS ILT

---

Chez l'homme, la famille de gène ILT (aussi connu sous les termes LILR, LIR ou CD85) est localisée sur le chromosome 19q13.4 à proximité des gènes KIR. D'un ensemble de 13 gènes ILT, seuls deux codent pour des récepteurs inhibiteurs ayant pour ligand le CMH I : ILT2 (LILRB1/LIR1) et ILT4 (LILRB2/LIR2) (Colonna et al., 1997). ILT4 n'est pas exprimé par les lymphocytes NK. ILT2 est une glycoprotéine avec 4 domaines de type Ig exprimés à la surface cellulaire et 4 séquences ITIM dans la partie cytoplasmique. ILT2 est exprimée de manière variable par les lymphocytes NK périphériques (de 0% à 75%). ILT2 se fixe avec une faible affinité à une région conservée du domaine  $\alpha 3$  de toutes les protéines de CMH I (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G) (Chapman et al., 1999). Bien que ILT2 puisse réprimer les fonctions NK après interaction avec son ligand (Navarro et al., 1999), sa faible affinité pour ces ligands semble la reléguer à un rôle plus accessoire, les protéines de la famille KIR et CD94/NKG2A assurant le rôle dominant dans le contrôle des réponses NK. Pourtant, certaines protéines virales, comme la glycoprotéine UL18 encodée par HCMV, possèdent une affinité 1000 fois supérieure avec ILT2 par rapport aux ligands classiques de ce récepteur. Cette voie de signalisation pourrait utiliser UL18 comme leurre pour contourner les réponses NK au cours d'une infection virale (Beck and Barrell, 1988; Chapman et al., 1999).

---

#### 1.4.2 RECEPTEURS SPECIFIQUES DU CMH I NON CLASSIQUE

Le récepteur NKG2D reconnaît des glycoprotéines du CMH I non classique, structurellement proches des protéines du CMH I mais non codées par le complexe de gène du CMH et ne présentant pas de peptides associés. Le gène de NKG2D se situe au niveau du chromosome 12p12.3-p13.2 chez l'homme et sur le chromosome 6 chez la souris. Le gène de NKG2D ne présente aucun polymorphisme chez l'homme ou la souris. Le gène de NKG2D se situe à proximité des autres gènes NKG2. Pourtant il a très peu d'homologie avec ces protéines

(Houchins et al., 1991). NKG2D est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des lectines C, exprimée à la surface de tous les lymphocytes NK humains et murins sous la forme d'un homodimère (Jamieson et al., 2002). L'expression de NKG2D peut être stimulée par l'IL-15 (Roberts et al., 2001) ou le TNF- $\alpha$  et réprimée par le TGF- $\beta$  (Lee et al., 2004).

NKG2D ne s'associe pas au CD94 (Wu et al., 1999) mais s'apparie préférentiellement avec DAP10 ou DAP12 afin de pouvoir être présenté à la membrane (Diefenbach et al., 2002; Gilfillan et al., 2002). Chez la souris, il existe deux isoformes pour NKG2D issues d'un épissage alternatif qui diffèrent d'une séquence de 13 acides aminés dans la partie N-ter de la portion cytoplasmique (Diefenbach et al., 2002). L'isoforme courte (NKG2D-S) peut s'associer à DAP10 ou DAP12 alors que la forme longue ne s'apparie qu'à DAP10. Chez l'homme, seul la forme longue est transcrite et par conséquent NKG2D ne peut s'associer qu'avec DAP10. Des études ont montré que la partie N-ter supplémentaire dans la forme longue semble prévenir l'association avec DAP12 chez l'homme expliquant les disparités entre les modèles humains et murins (Rosen et al., 2004). La conséquence directe de cette association différentielle réside dans la signalisation induite par NKG2D chez l'homme et la souris. DAP12 active les voies Syk et ZAP70 à l'aide de ces séquences ITAM (Lanier et al., 1998b) alors que DAP10 ne possède pas de séquences ITAM et recrute la sous-unité p85 de la PI3K pour sa signalisation. Les phosphorylations de JAK2, STAT5, ERK1/2 et MEK1/2 sont aussi observées après stimulation de l'activité NKG2D (Sutherland et al., 2002). Enfin, la stimulation par NKG2D peut activer vav1, la famille des Rho GTPases et PLC- $\gamma$ 2 (Billadeau et al., 2003). Chez l'homme, la signalisation par NKG2D n'implique pas le recrutement et l'activation de Syk et ZAP70 mais passe uniquement par la PI3K ce qui est étonnant au vue de l'intensité du signal transmis. De plus, des modèles murins knock-out pour DAP12, Syk ou ZAP70 n'ont montré aucune différence dans la cytotoxicité dépendante de NKG2D suggérant une préférence de la voie utilisant DAP10 (chez la souris) (Zompi et al., 2003).

Les ligands de NKG2D (NKG2DL) sont une famille de protéines dont la structure est homologue au CMH I. Les NKG2DL chez l'homme sont MHC class I polypeptide-related sequence (MIC) A et MICB, UL16 binding protein (ULBP) 1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 et RAET1 et RAE-1 $\alpha$ , RAE1-1 $\beta$ , RAE-1 $\gamma$ , RAE-1 $\delta$ , RAE-1 $\epsilon$ , H60 et MULT1 chez la souris (Cosman et al., 2001; Diefenbach et al., 2001). Seuls MICA et MICB sont encodés par des gènes appartenant au complexe du CMH associé à HLA-B (Bahram et al., 1994). Les gènes RAE-1, H60 et MULT1 sont situés au niveau du chromosome 10. Tous ces ligands possèdent les domaines caractéristiques  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 du CMH I mais ne présentent pas de peptide. Les protéines de la famille RAE-1 ont une forte homologie (>85%) ce qui n'est pas le cas des protéines H60 et MULT1 (25%). De la même façon, si les protéines MIC sont fortement homologues, elles ne partagent que peu de motifs avec les protéines de la famille ULBP (<20%). De plus, ces protéines sont différemment associées à la membrane cellulaire. Les molécules ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3 et RAE-1 sont ancrées grâce à des phosphatidylinositol-glycan alors que les protéines MICA, MICB et ULBP-4 ainsi que les molécules H60 et MULT1 possèdent des domaines transmembranaires spécifiques. Etant donnée la grande variété de structures existantes entre les différents ligands, il est remarquable d'observer une association de forte affinité avec NKG2D. Ainsi, les analyses structurales des interactions NKG2D-MICA, NKG2D-ULBP3 ou encore NKG2D-RAE-1 $\beta$  montrent que l'organisation ligand/récepteur est très similaire bien que les résidus utilisés soient complètement différents (Li et al., 2001; Radaev et al., 2001).

Les gènes MIC sont très polymorphiques (54 allèles pour MICA et 18 allèles pour MICB) et ces variances peuvent engendrer des modifications d'affinité pour les protéines encodées correspondantes (Steinle et al., 2001).

Il existe peu de données sur la régulation des NKG2DL. L'équipe de Spies et coll. a identifié des éléments de réponse au choc thermique dans les séquences des promoteurs de MICA et MICB (Groh et al., 1996). Différentes conditions de stress cellulaire (choc thermique, stress génotoxiques) ont été directement associées à une induction différentielle des ligands de NKG2D (Gasser et al., 2005; Groh et al., 1996). En outre, la transcription de RAE-1 est induite en réponse à la signalisation des récepteur Toll chez la souris (Hamerman et al., 2004) et par les infections virales (Lodoen et al., 2003).

NKG2D est impliqué dans l'immunité antivirale et anti-tumorale. Chez la souris, le lymphome RMA n'exprime pas physiologiquement les NKG2DL et résiste aux fonctions cytotoxiques NK *in vivo* et *in vitro*. Lorsque ces mêmes cellules sont transfectées avec RAE-1 et H60, elles deviennent sensibles à la lyse par les cellules NK *in vitro* et les tumeurs RMA sont rejetées *in vivo* (Diefenbach et al., 2001). Il a ainsi été démontré une forte expression de certains NKG2DL dans des cancers d'origines variées, renforçant l'intérêt de cette voie dans la défense anti-tumorale (Diefenbach et al., 2000; Groh et al., 1999).

Chez l'homme, l'importance de NKG2D dans l'immunité antivirale est très bien caractérisée (A-MuLV, influenza A, Sendai virus) (Gourzi et al., 2006; Siren et al., 2004) notamment dans la réponse contre le CMV. En effet, c'est en utilisant la protéine recombinante UL16 encodée par le CMV que les NKG2DL de type ULBP ont été identifiés (Cosman et al., 2001). Pourtant, UL16 a une faible affinité et ne peut entrer en compétition avec NKG2D pour la fixation des ULBP1, ULBP2 et ULBP3. Son mode d'action consiste à interagir au niveau intracellulaire avec ces ligands, dégrader les protéines et prévenir leurs expressions membranaires pour limiter la sensibilité des cellules infectées aux lymphocytes NK (Dunn et al., 2003). Ces mécanismes de séquestration et de dégradation intracellulaire ont aussi été mis en évidence chez la souris (Krmptic et al., 2002; Lodoen et al., 2003; Lodoen et al., 2004).

Ces données illustrent l'importance de la voie NKG2D en immunité antivirale et anti-tumorale.

### 1.4.3 RECEPTEURS SPECIFIQUES DE MOLECULES INDEPENDANTES DU CMH I

Bien que les fonctions des lymphocytes NK soient en grande partie régulées par des molécules associées au CMH I, il a été démontré que les cellules NK étaient capables de tuer des cibles n'exprimant pas les molécules du CMH I ou les ligands de NKG2D (Sivori et al., 1999). Ainsi la lignée murine RMA/S, le mélanome murin B16 ou encore la lignée de lymphoblaste humain 721.221 B sont tous sensibles aux fonctions cytotoxiques des lymphocytes NK alors qu'ils n'expriment pas les ligands activateurs décrits précédemment. Après ces premières observations, les travaux réalisés sur ces récepteurs particuliers, notamment par des techniques de lyses redirigées, ont permis de mettre en évidence la famille des récepteurs naturels de cytotoxicité (NCR). Par la suite, d'autres récepteurs NK n'ayant pas pour ligands des molécules du CMH I ont été décrits et on peut dénombrer les récepteurs au fragment constant (Fc) des anticorps, Les récepteurs Toll (Toll-like receptor, TLR), les récepteurs de mort (TRAIL, CD95/CD95L), les récepteurs de la famille SLAM (2B4, NTB-A, CRACC), DNAM-1 et CD2 chez l'homme et la souris.

#### 1.4.3.1 LES RECEPTEURS NATURELS DE CYTOTOXICITE

---

Les NCR sont définis par leur aptitude à induire une cytotoxicité des lymphocytes NK lorsqu'ils sont stimulés par un anticorps activateur spécifique. Quatre NCR ont été identifiés chez l'homme et décrits dans la littérature : NKp30, NKp44, NKp46 et NKp80 (Moretta et al., 2000). Ce sont des protéines de la superfamille des Ig qui ont une très faible homologie entre elles mais qui présentent des conséquences similaires sur l'activité du lymphocyte NK. Il

existe une complémentarité entre les NCR et un blocage spécifique de chaque NCR n'éteint pas totalement la réactivité des lymphocytes NK vis-à-vis de leur cible. Une synergie est également suspectée car l'engagement d'un NCR abouti à une activation des cascades de signalisation associées aux autres NCR (Augugliaro et al., 2003). Par conséquent, l'activation combinée de plusieurs récepteurs permet de dépasser le seuil d'activation nécessaire alors qu'indépendamment ce seuil ne serait pas atteint. Enfin, l'efficacité de la stimulation par les NCR est corrélée à la densité d'expression des récepteurs et elle favorise la mobilisation du  $Ca^{2+}$ , la cytotoxicité cellulaire et la sécrétion cytokinique du lymphocyte NK.

NKp46 (NCR1) est le premier membre identifié de cette famille. C'est une glycoprotéine de type I de 46 kDa, uniquement exprimée par les lymphocytes NK, qu'ils soient au repos ou activés. Elle est associée à des homodimères CD3 $\zeta$ et/ou des hétérodimères CD3 $\zeta$ /Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  pour sa signalisation. Un homologue murin (NCR1) qui présente environ 60% d'homologie avec la forme humaine a été décrit, c'est le seul homologue de cette famille chez la souris (Biassoni et al., 1999).

NKp44 (NCR2) est une glycoprotéine de type I sélectivement exprimée par les lymphocytes NK activés *in vitro* (au cours d'une culture avec de l'IL-2 par exemple) et retrouvée sur les lymphocytes NK CD56<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> des amygdales *in vivo*, représentants physiologiques des NK activés *in vivo*. Nkp44 est une glycoprotéine de 44 kDa qui est spécifique des lymphocytes NK. Elle s'associe à DAP12 pour sa signalisation. Son expression permet d'augmenter les cibles potentielles, insensibles aux lymphocytes NK lorsque ces derniers sont au repos. Par conséquent, les ligands de ce récepteur ne sont pas les mêmes que ceux des autres NCR.

NKp30 (NCR3) est une glycoprotéine de 30 kDa exprimée sur les lymphocytes NK activés et au repos. Son expression est coordonnée à celle de NKp46 puisque les cellules NKp46<sup>high</sup> sont aussi NKp30<sup>high</sup>. NKp30 s'associe à CD3 $\zeta$  pour exercer ces fonctions chez la cellule NK.

NKp80 est le dernier membre identifié de la famille des NCR (Vitale et al., 2001). Cette protéine forme un homodimère composé de deux protéines de 40 kDa à la surface de la cellule. Elle est exprimée de manière corrélée avec les autres NCR de sorte que les NCR<sup>high</sup> expriment fortement NKp80 et les NCR<sup>dull</sup> ne le présentent pas.

Les ligands des NCR sont encore peu connus. Les NCR sont impliqués dans la lyse de nombreuses cibles malignes ou non qui peuvent être autologues (lignée B-EBV transformée), allogéniques (MDAM B231, K562) ou encore xénogéniques (YAC-1, M12). Cela suggère que certains ligands des NCR peuvent être conservés entre les espèces. Récemment, un ligand spécifique de NKp30 a été identifié chez de nombreuses lignées tumorales (Brandt et al., 2009). Cette protéine nommée B7-H6, de part sa forte homologie structurelle avec les molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2, déclenche l'activation des lymphocytes NK par un mécanisme strictement dépendant de NKp30. B7-H6 est donc le premier ligand tumoral décrit de NKp30.

Il a été démontré que le récepteur NKp30 reconnaissait un ligand inconnu exprimé sélectivement par les cellules dendritiques immatures (Degli-Esposti and Smyth, 2005) ce qui aboutirait à une activation de la DC ou une lyse de cette cellule en fonction du contexte environnemental. Dernièrement, le blocage de NKp80 dans des expériences de lyses redirigées n'a pas démontré une implication de ce récepteur dans la lyse de cellules tumorales. Par contre, des co-cultures avec des lymphocytes T allogéniques activés avec de la PHA ont révélé une inhibition des fonctions NK à l'encontre de ces cellules lorsque NKp80 était bloqué par un anticorps neutralisant (Vitale et al., 2001). En 2006, l'équipe de Steine A. et coll. a identifié activation-induced C-type lectin (AICL) comme ligand de NKp80 (Welte et al., 2006). Cette protéine est fortement exprimée par les monocytes, macrophages et granulocytes au cours de stimulation via différents récepteurs Toll (TLR-2,-3,-4,-6,-9) et

semble promouvoir la sécrétion de TNF- $\alpha$  lorsqu'elle est stimulée. L'expression d'AICL par les monocytes pourrait être reconnue par les cellules NK et permettrait un contrôle de ces populations au cours des phases inflammatoires. Ces différentes données impliquent les NK dans les mécanismes régulateurs des populations immunitaires au cours de la réponse inflammatoire.

Enfin, certaines protéines virales comme les molécules d'hémagglutinine provenant de différentes souches *influenza* serviraient de ligands à NKp46 et NKp44 (Arnon et al., 2001; Mandelboim et al., 2001). De plus, Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de patients atteints du HIV présentent à leur surface des ligands de NKp44 (Fausther-Bovendo et al., 2009). Pourtant, cette expression est réprimée par la protéine virale nef, prévenant ainsi l'effet bénéfique des lymphocytes NK. Un autre ligand viral décrit est la protéine de HCMV, pp65, qui s'oppose à l'action de NKp30 par dissociation du couple NKp30/CD3 $\zeta$  (Arnon et al., 2005). De la même façon, AICL peut être inhibé par la protéine virale K5 associée à (Kaposi's sarcoma associated virus ; Virus associé au sarcome de Kaposi) KSHV (Thomas et al., 2008). Le nombre croissant de mécanismes d'évasion engendrés par les virus à l'encontre des récepteurs NCR souligne l'importance de ces récepteurs et des lymphocytes NK dans les défenses antivirales de l'organisme.

Des données publiées en 2004 indiquent que le sulfate d'héparane pourrait jouer le rôle de ligand de NKp46 et NKp30 (Bloushtain et al., 2004). Pourtant, ce polysaccharide est exprimé sur les cellules saines non lysées par les NK et semblerait finalement agir comme un co-récepteur. En outre, des études sur le rôle des NK dans la défense antibactérienne ont établi que NKp44 et NKp46 pouvaient interagir avec des motifs exprimés (vimentine) par les mycobactéries et les espèces associées (*Norcadia farcinica* et *Pseudomonas Aeruginosa*) (Esin et al., 2008; Garg et al., 2006).

#### 1.4.3.2 LES RECEPTEUR DE Fc

---

Les récepteurs Fc sont exprimés par de nombreux types cellulaires incluant les macrophages, les monocytes, les granulocytes, les neutrophiles et plus particulièrement les lymphocytes NK (Trinchieri and Valiante, 1993). Ces protéines ont une fonction de reconnaissance des fragments constants (Fc) des anticorps présents à la surface des pathogènes (bactéries, cellules infectées par un virus ou tumorales). Ces protéines de la superfamille des Ig sont subdivisées en trois groupes ; Les récepteurs Fc $\gamma$ , Fc $\alpha$  et Fc $\epsilon$ ; dont le profil d'expression est différent d'un type cellulaire à l'autre. Chaque sous groupe de récepteur Fc reconnaît un type d'anticorps différent (à savoir, IgG, IgA et IgE respectivement). La reconnaissance du fragment Fc induit l'ADCC chez les lymphocytes NK.

Les lymphocytes NK sont caractérisés en partie par le niveau d'expression d'un récepteur de fragment Fc (CD16, FcR $\gamma$ III) comme il a été vu précédemment. Le récepteur FcR $\gamma$ III est un récepteur de faible affinité pour les IgG. Par conséquent, il est nécessaire pour la cellule NK d'interagir avec un grand nombre d'anticorps pour pouvoir initier cette voie d'activation. Le CD16 s'associe au CD3 $\zeta$  ou la sous-unité Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  au niveau intracellulaire pour aboutir à l'activation de Syk et ZAP70. L'activation du lymphocyte NK par la voie ADCC stimule la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et l'induction de la cytotoxicité cellulaire par la libération de granules contenant les granzyme B/perforine. Certains individus peuvent exprimer le récepteur Fc $\gamma$ RII ou CD32 à la surface de leur cellules NK (Morel et al., 1999) renforçant les fonctions dépendant de l'ADCC des lymphocytes NK associés.

Un rôle important de ces récepteurs et de leurs polymorphismes a été démontré dans les immunothérapies basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ainsi, le polymorphisme substituant la valine (V) à la phénylalanine à la position 158 (V/V ou V/F) a pour conséquence une meilleure affinité du récepteur CD16 pour les IgG et une expression

augmentée du récepteur. Cette modification implique une meilleure réponse du patient au traitement utilisant le rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 et utilisé dans les traitements des lymphomes (Hatjiharissi et al., 2007). En outre, la présence de polymorphisme dans les récepteurs FcγR peut influencer la sévérité des maladies immunitaires associées aux auto-anticorps telles que l'arthrite rhumatoïde (Stewart-Akers et al., 2004).

#### 1.4.3.3 LES RECEPTEURS TOLL

---

Les récepteurs TLR appartiennent à une famille des récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires conservés ou PRR (Pattern-Recognition Receptors). Les TLR reconnaissent des molécules ou protéines (appelé PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns) dont l'expression est conservée dans de nombreux micro-organismes, notamment les bactéries ou les parasites. Ces récepteurs sont exprimés par de nombreuses cellules immunitaires et contribuent à l'efficacité de la réponse innée. Chez les lymphocytes NK, la présence d'ARNm des TLR1-10 a été reportée (Lauzon et al., 2006) mais le nombre de TLR fonctionnels chez les NK est plus limité. Les NK stimulés par les ligands du TLR2 (Peptidoglycane, KpOmpA), TLR3 (Poly I:C), TLR4 (LPS), TLR5 (flagelin) TLR9 (CpG ODN A et ODN B) et TLR7/TLR8 (R-848 et ARN HIV) répondent par une production notable et variable d'IFN-γ et de TNF-α (Becker et al., 2003; Chalifour et al., 2004; Schlaepfer and Speck, 2008; Schmidt et al., 2004; Sivori et al., 2004). De plus, leur activité cytotoxique est accrue et leur activation permet par la suite une meilleure stimulation de l'immunité adaptative.

#### 1.4.3.4 LES RECEPTEURS DE LA FAMILLE SLAM

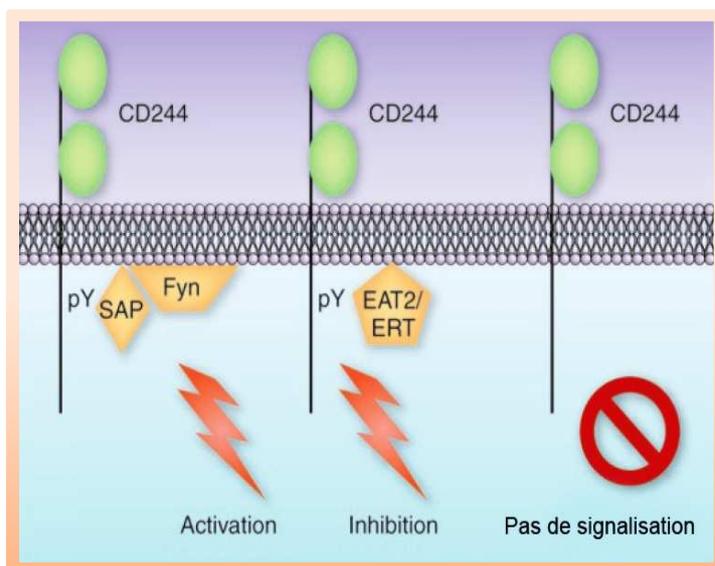
---

Les lymphocytes NK expriment trois membres de la famille SLAM : 2B4 (CD244), NTB-A et CRACC (CD319) chez l'homme et 2B4 et CRACC chez la souris. Seul 2B4 a un ligand

spécifique de la sous-famille de CD2 (CD48, exprimé par les cellules hématopoïétiques) et les autres protéines de cette famille transmettent leur signal par des interactions homotypiques (Veillette, 2006).

2B4 a été initialement découvert chez la souris (Garni-Wagner et al., 1993) où son activation par un anticorps spécifique avait pour conséquence une sécrétion d'IFN- $\gamma$  et une cytotoxicité NK accrue. Par la suite, la molécule fut décrite chez l'homme (Moretta et al., 1992). 2B4 est une molécule de 70 kDa de la superfamille des Ig qui possède 4 motifs activateurs particuliers immunoreceptor tyrosine-based switch motif (Thr-x-Tyr-x-x-Leu/Ile, ITSM) dans sa portion intracellulaire. Ces motifs sont caractéristiques d'une voie de signalisation recrutant la famille de protéines associées à SLAM (SAP) i.e. SAP, EAT-2 (Erwing's sarcoma-activated transcript-2) et ERT (EAT-2-related transducer). Lorsque la protéine SAP est présente, son association aux domaines ITSM permet le recrutement de la kinase Fyn et par conséquent l'activation des fonctions NK. Les mécanismes de signalisation impliquant ERT et EAT-2 sont encore peu connus mais la présence de tyrosines dans leur partie C-ter suggère le recrutement de protéines effectrices supplémentaires. Des études biochimiques ont montré que ces deux protéines induisent *in fine* la phosphorylation de la PLC- $\gamma$ 1 et PLC- $\gamma$ 2 et l'activation de la PI3K. Chez l'homme, 2B4 agit en tant que co-récepteur. En effet, des expériences de lyses redirigées ont montré que la présence seule de 2B4 ne permettait pas l'activation du lymphocyte NK alors que sa stimulation conjointe avec la voie NKp46 permettait un signal activateur plus intense (Sivori et al., 2000a). Chez l'homme, le rôle de 2B4 a été fortement documenté dans le cadre de syndrome lympho-prolifératif lié au chromosome X (XLP). Cette maladie est caractérisée par une réponse inadéquate et incontrôlée de l'immunité au virus de l'Epstein-Barr (EBV). Les patients souffrant d'XLP possèdent un gène SAP muté et inactivé et les lymphocytes NK dérivés de patients atteints de cette pathologie présentent une incapacité à lyser les cellules exprimant CD48, suggérant un

rôle direct de la voie d'activation 2B4/CD48 dans la perte de contrôle de l'infection par l'EBV (Nakajima et al., 2000; Parolini et al., 2000). De plus, des modèles murins déficients en SAP ont démontré une conversion des fonctions activatrices de 2B4 en fonctions inhibitrices (Bloch-Queyrat et al., 2005). Ce résultat laisse penser à une signalisation ambivalente, dépendante de la présence ou non des molécules SAP, et qui pourrait favoriser le développement incontrôlé de la maladie. En effet, lors d'études concernant les molécules EAT-2 et ERT, les modèles déficients pour ces protéines présentaient une sécrétion accrue d'IFN- $\gamma$  suite à l'activation des voies 2B4, CD16 ou encore NKG2D. Ces résultats indiqueraient un rôle inhibiteur des molécules EAT-2 et ERT. Collectivement, la signalisation de 2B4 dépend donc d'un équilibre entre l'expression des trois molécules de co-stimulation (variable entre les sous populations NK (Vacca et al., 2006)) pour aboutir à un signal activateur ou inhibiteur (Figure 6).



**Figure 6 - Signalisation du récepteur CD244.**

La signalisation du CD244 est dépendante des protéines disponibles au niveau intracellulaire. La phosphorylation de résidus tyrosine de la séquence ITSM permet le recrutement de trois protéines, SAP, EAT2 et ERT. Lorsque SAP est recruté, cette dernière se fixe à la kinase Fyn et permet d'activer le lymphocyte NK. Lorsque SAP n'est pas disponible ou lorsqu'EAT2 et ERT (seulement chez la souris) interagissent avec la séquence ITSM phosphorylée, il y a inhibition du lymphocyte NK.. Adapté de (Lanier, 2008).

En ce qui concerne NTB-A et CRACC, il a été démontré que ces récepteurs s'associaient spécifiquement à SAP et transmettaient un message activateur au lymphocyte NK (Stark and Watzl, 2006). De plus, la surexpression de ces deux protéines sur les cibles favorise la lyse NK à leur rencontre, renforçant le rôle activateur de ces deux protéines sur les fonctions NK.

#### 1.4.3.5 DNAM-1

---

Le récepteur DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1, CD226) est un membre de la superfamille des Ig exprimé par l'ensemble des lymphocytes NK mais aussi les lymphocytes T, B et les monocytes. Les ligands de ce récepteurs sont entre autres le CD112 (récepteur du virus de la polio, PVR) et le CD155 (nectine-2) (Tahara-Hanaoka et al., 2004). DNAM-1 s'associe à LFA-1 à la surface des lymphocytes NK ce qui permet de favoriser la phosphorylation des résidus tyrosines présents dans la partie intracellulaire de la protéine lorsqu'elle reconnaît son ligand. La phosphorylation de DNAM-1 est dépendante de Fyn et a pour conséquence une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et des facultés cytotoxiques NK. De plus, les propriétés migratoires des monocytes font intervenir DNAM-1 et CD155 et il est envisageable que ces protéines exercent le même type de rôle chez les lymphocytes NK. L'expression de CD112 et CD155 est augmentée dans de nombreux types de cancer, notamment dans les mélanomes (Chan et al., 2009) ou les carcinomes ovariens (Carlsten et al., 2009) ce qui implique directement DNAM-1 dans les fonctions anti-tumorales des lymphocytes NK.

#### 1.4.3.6 LE CD2

---

Le récepteur CD2 est une glycoprotéine transmembranaire de 50 kDa qui s'associe au CD3 $\zeta$  pour assurer sa signalisation (Moingeon et al., 1992). Il a pour ligand la protéine d'adhésion LFA-3 (CD58) et joue un rôle primordial dans la formation d'une SI.

## 1.5 TRANSMISSION DU SIGNAL

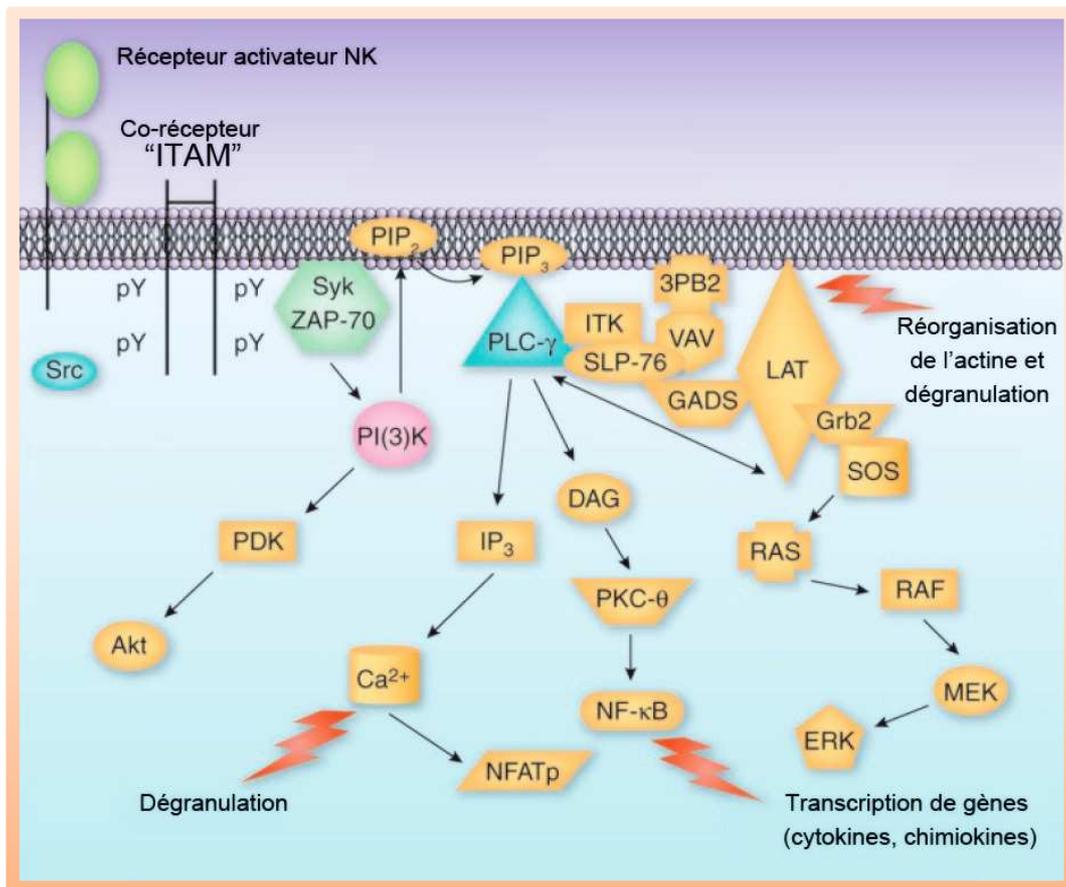
La signalisation de la grande majorité des récepteurs inhibiteurs et activateurs NK est associée à la présence de séquences consensus conservées dans le domaine cytoplasmique des récepteurs ou des co-récepteurs associés. Dans leur portion intra-cytoplasmique, les récepteurs inhibiteurs NK possèdent une ou plusieurs copies d'une séquence consensus Ile/Val/Leu/Ser-x-Tyr-x-x-Leu/Val, x définissant un acide aminé quelconque. Cette séquence spécifique est un motif ITIM découvert dans un premier temps sur le récepteur FcγRIIb exprimé par les lymphocytes B (Muta et al., 1994). La séquence ITIM est retrouvée sur de nombreux récepteurs inhibiteurs et sur tous les récepteurs inhibiteurs NK. Après interaction avec leur ligand, les résidus Tyrosine de la séquence ITIM sont phosphorylés par une kinase de la famille Src. Les lymphocytes NK expriment une grande variété de kinase appartenant à cette famille, notamment Lck, Fyn, Src, Yes, Lyn et Fgr, ce qui assure une grande stabilité de cette voie de signalisation. Cette phosphorylation entraîne un changement de conformation qui favorise l'association avec le domaine SH (Src homology) 2 (SH2) des phosphatases SHP SHP1, SHP-2 ou encore SHIP (Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase 1)-1 (Parihar et al., 2005; Ware et al., 1996) en fonction du récepteur concerné. Le déplacement de ces phosphatases au niveau de la membrane cellulaire va entraîner une régulation locale et transitoire des états de phosphorylation des récepteurs activateurs, une abrogation de l'afflux calcique et une diminution des fonctions NK i.e. dégranulation cytotoxique, production cytokinique et prolifération cellulaire.

SHIP-1 dégrade le phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate (PI-3,4,5-P<sub>3</sub>) en phosphatidylinositol-3,4-biphosphate (PI-3,4-P<sub>2</sub>) et limite la production de PIP<sub>3</sub> par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Backers et al., 2003). Les voies de signalisation affectées par SHIP-1 sont les phospholipases (PL) et par conséquent l'afflux calcique, la

protéine kinase (PK) B, PKC, et la voie Ras–mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Falasca et al., 1998; Galandrini et al., 1996; Kanakaraj et al., 1994; Trotta et al., 1996). Le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 s'accompagne d'une diminution de la phosphorylation de nombreux médiateurs intracellulaires comme ZAP70, Syk, PLC $\gamma$ 1, PLC $\gamma$ 2, Shc, LAT, SLP76 et Vav-1, Lck, (Binstadt et al., 1998; Binstadt et al., 1996; Palmieri et al., 1999; Stebbins et al., 2003; Valiante et al., 1996). On ne sait pas si ces protéines sont des substrats directs de SHP-1 et SHP-2 ou sont affectées par des mécanismes indirects résultant d'une activation de SHP-1 ou SHP-2. A noter que ces événements sont transitoires et locaux, ce qui n'interfère pas avec les autres interactions subséquentes du lymphocyte NK.

Les récepteurs activateurs des lymphocytes NK ne possèdent pas de queue cytoplasmique assez grande ; ils s'associent grâce des interactions entre des aminoacides de charges opposées dans la partie transmembranaire, à des protéines adaptatrices pour leur signalisation intracellulaire. Ces protéines adaptatrices utilisent une séquence commune avec le TCR ou le BCR, présente dans la partie intracytoplasmique, nommée ITAM pour « immunoreceptor tyrosine-based activation motif » par analogie avec les ITIM. La séquence ITAM est définie par la séquence consensus Asp/Glu-x-x-Leu/Ile-x<sub>6,8</sub>Tyr-x-x-Leu/Ile. Les lymphocytes NK expriment 4 molécules adaptatrices responsables de leur activation et présentant des séquences ITAM : Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  (Hibbs et al., 1989), CD3 $\zeta$  (Anderson et al., 1989), KARAP/DAP12 (Lanier et al., 1998b) et DAP10 (Wu et al., 1999). DAP12 et Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  possèdent une séquence ITAM par chaîne alors que le CD3 $\zeta$  possède 3 séquences par chaîne. La première association observée entre un récepteur activateur NK et un adaptateur était avec le CD16 (Fc $\gamma$ RIII). Chez l'homme, il peut interagir avec Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  (Hibbs et al., 1989) ou CD3 $\zeta$  (Lanier et al., 1989) alors que chez la souris il ne s'associe qu'avec Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  (Kurosaki et al., 1991). Ces différentes protéines adaptatrices possédant les séquences ITAM peuvent s'associer avec plusieurs récepteurs activateurs NK et leurs confèrent des fonctions de

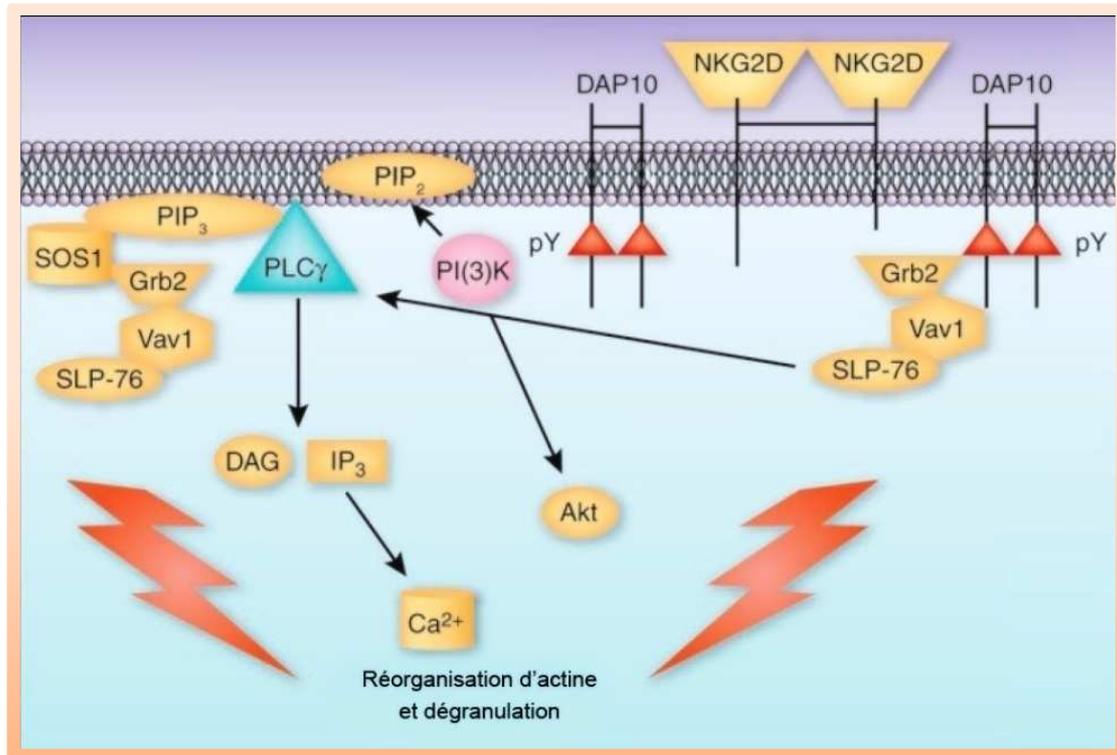
signalisation. La cascade de signalisation en aval de DAP12, FcεRIγ et CD3ζ est très proche de celle observée pour les lymphocytes T et B après stimulation de leur TCR ou BCR. Après phosphorylation des ITAM sur les résidus tyrosine par une kinase de la famille Src, les tyrosines kinases ZAP70 et Syk sont recrutées grâce à leur domaine SH2 au niveau membranaire pour stimuler les signalisations en aval de l'activation NK (Influx Ca<sup>2+</sup>, dégranulation cytotoxique, production cytokinique, transcription de gène) (Figure 7).



**Figure 7 - Signalisation associée aux co-récepteurs de type ITAM.**

Brièvement, les séquences ITAM sont phosphorylées par les kinases de la famille Src, après engagement du récepteur. Les protéines Syk et ZAP-70 (exprimées chez l'homme et la souris) sont recrutées par les séquences ITAM phosphorylées. La voie de signalisation présentée ici est hypothétique et résulte des déductions obtenues des nombreux modèles d'études humains et murins réalisés au cours des années. DAG, Diacylglycérol, IP3, inositol-3,4,5-trisphosphate; PIP2, phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate; PIP3, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; pY, phosphotyrosine; ITK, tyrosine kinase; GADS and 3BP2, adaptor proteins; NFATp and NF-κB, transcription factors; PDK, phosphoinositide-dependent protein kinase; PKC-θ, protein kinase C-θ; RAF, mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase kinase; RAS, GTPase. (Adapté de (Lanier, 2008).

Il est intéressant de noter que les lymphocytes NK disposent d'une activité lytique chez les souris déficientes pour Syk et ZAP70 bien que l'activité associée aux récepteurs dépendants des ITAM soit détériorée (Colucci et al., 2002). Cela peut s'expliquer par la présence de récepteur activateur utilisant le co-récepteur DAP10. Contrairement à DAP12, CD3 $\zeta$  et Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , DAP10 ne possède pas de séquences ITAM. La séquence intracellulaire de DAP10 est très courte avec seulement 21 acide aminés et contient un seul motif connu : une séquence YINM, Tyr-x-x-Met, x définissant un acide aminé quelconque (Wu et al., 1999). Après phosphorylation, cette séquence permet le recrutement de la sous-unité p85 de la PI3K ou la protéine adaptatrice Grb2 (Figure 8). La séquence de fixation étant unique, il ne peut y avoir qu'une protéine p85 ou Grb2 associée à la fois. Les deux voies de signalisation semblent pourtant nécessaires et complémentaires puisque des études réprimant indépendamment chaque voie ont montrées que cela inhibait intégralement l'activité cytolytique associée à DAP10 (Billadeau et al., 2003; Upshaw et al., 2006). L'engagement de Grb2 active les protéines Vav1 et SLP-76 qui stimulent la voie activée par la PI3K (i.e. PLC $\gamma$ ) par la suite. Enfin, la voie d'activation par NKG2D semble privilégier des signaux activateurs de la cytotoxicité cellulaire, au détriment des productions cytokiniques.



**Figure 8 - Signalisation associée aux co-récepteurs de type DAP10.**

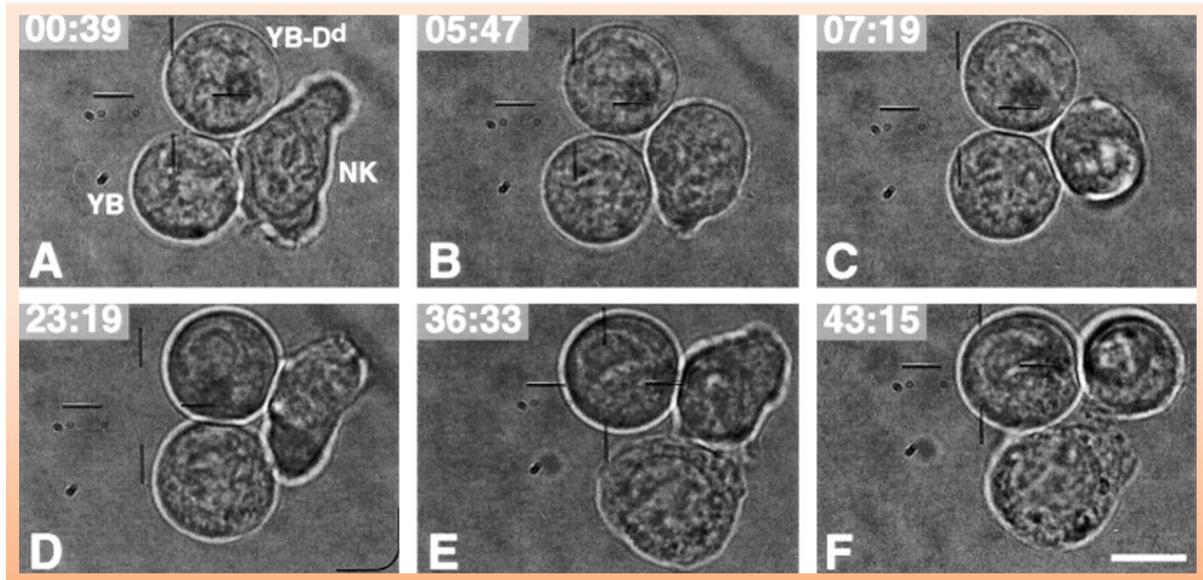
La stimulation de NKG2D entraîne l'activation des lymphocytes NK par le recrutement de p85 ou du complexe protéique Grb2-Vav1-SLP-76 sur le motif YINM phosphorylé présent dans le domaine cytoplasmique de DAP10. Les événements cellulaires subséquents sont présentés ici (*Adapté de(Lanier, 2008).*

## 1.6 LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE

Si l'intégration des différents signaux activateurs et inhibiteurs perçus par le lymphocyte NK met en jeu un nombre varié de mécanismes de reconnaissance, l'aboutissement de ces signaux conduit systématiquement à la formation d'un complexe protéique appelé synapse immunologique (SI). Ce complexe protéique engendre la réorganisation structurée de la F-actine qui permet aux lymphocytes NK d'exercer leurs fonctions effectrices.

Les premières observations suggérant l'existence d'une structure macromoléculaire contrôlant les fonctions effectrices NK proviennent des travaux de Eriksson (Eriksson et al., 1999). Des

études en vidéo-microscopie indiquaient une interaction simultanée du lymphocyte NK avec plusieurs cibles potentielles. L'issue de cette interaction était différente pour la cellule sensible à la lyse NK (négative pour l'expression du CMH I) et insensible (positive pour l'expression du CMH I) (Figure 9).



**Figure 9–Concept de synapse immunologique.**

Le contact de la cellule NK avec une cellule sensible YB classe I négative (en bas) et une cellule YB D<sup>d</sup> classe I positive stimule son activation. Pourtant, si on observe la formation de synapse dans les deux cas, seule la cellule sensible à la lyse NK (classe I négative) est détruite alors que la cellule résistante (classe I positive) reste intègre. (Adapté de (Eriksson et al., 1999).

Par la suite cette structure fut intensivement étudiée et nommée SI de par son étonnante similarité avec la synapse neuronale. Ainsi, la SI NK se définit comme le contact entre le lymphocyte NK et une autre cellule aboutissant à une ségrégation et une réorganisation des protéines de signalisation à l'interface entre les deux cellules concernées. Il faut alors dissocier deux types de synapses immunologiques, celle concernant l'interaction entre une cellule NK et une cible déficiente pour l'expression du CMH I (synapse immunologique NK activatrice, aNKIS) et celle concernant une cellule NK et une cible exprimant le CMH I

(synapse immunologique NK inhibitrice, iNKIS). A noter que la formation d'une synapse est limitée spatialement à l'interaction entre la cellule cible et le lymphocyte NK, permettant la création simultanée d'aNKIS et iNKIS.

---

### 1.6.1 aNKIS

La formation d'une aNKIS est un processus séquentiel (Orange et al., 2003) qui fait intervenir dans l'ordre : (1) un contact puis l'adhérence cellulaire, (2) une signalisation initiant une ségrégation précoce des protéines, (3) une réorganisation du cytosquelette d'actine, (4) une amplification du signal d'activation et un rassemblement accentué des récepteurs activateurs, (5) la réorganisation des microtubules et la polarisation des Centres d'Organisation des Microtubules (MTOC) associés aux granules cytotoxiques, (6) la dégranulation des granules cytotoxiques et (7) la destruction de la synapse.

Suite au contact entre les deux cellules, les molécules d'adhérences de type intégrine (LFA-1, Mac-1) s'organisent rapidement pour former une structure appelée pSMAC (peripheral supramolecular activation cluster) (Vyas et al., 2001). La pSMAC consiste en une concentration locale des molécules d'adhérence qui permet un maintien de l'interaction entre les deux cellules. Cette première étape est directement suivie par l'accumulation à la pSMAC de certaines protéines comme la taline, ERM (ezrin-radixin-moesin) ou WASp (Winston-Aldrich Syndrome protein) qui vont servir à la polymérisation des filaments de F-actine (Bryceson et al., 2006; Chen et al., 2006). De plus, LFA-1 peut induire la polarisation des lysosomes sécrétoires (Bryceson et al., 2005) et la phosphorylation précoce de protéine telles que Src, Vav-1, LAT, ZAP70 et la PKC initiant la signalisation activatrice du lymphocyte NK (Perez et al., 2004; Riteau et al., 2003). Cette étape, notamment l'accumulation de la protéine WASp (Wiskott-Aldrich syndrom protein), est cruciale pour les fonctions cytotoxiques des lymphocytes NK (Orange et al., 2002). Une fois activée par Cdc42 et PIP2, cette protéine

exprimée par les cellules hématopoïétiques s'associe au complexe Arp2/3 (Actin-related protein) et catalyse son activité de réorganisation et de polymérisation du cytosquelette de F-actine. Ainsi les patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich, caractérisé par une mutation du gène codant pour WASp, ont un déficit dans les fonctions cytotoxiques NK et la formation de synapse activatrice NK (Orange et al., 2002). Par la suite, d'autres molécules associées à la réorganisation du cytosquelette d'actine ont été décrites comme indispensables à la formation de synapses activatrices comme WIP (Krzewski et al., 2008) et CD2AP (Ma et al., 2009).

Après la mise en place de la pSMAC et la polymérisation du cytosquelette d'actine, il s'établit une structure centrale de la synapse, la cSMAC (central supramolecular activation cluster) qui a deux fonctions essentielles. La première est de regrouper les différents récepteurs activateurs localisés dans les radeaux lipidiques à l'interface entre le lymphocyte NK et la cible exprimant leur ligand et la seconde est de faciliter la réponse cytotoxique par la synergie et la complémentarité des signalisations activatrices résultantes (Bryceson et al., 2006). En effet, l'engagement de chaque récepteur permet le déroulement d'une étape clé de la formation synaptique. L'engagement des récepteurs activateurs conduit au recrutement rapide des molécules importantes pour la transduction du signal (Src, Lck, Fyn, Syk, ZAP70, SLP76, Vav-1, PLC $\gamma$ , PKC, LAT) dans les minutes suivant la formation de la cSMAC (Upshaw et al., 2006; Vyas et al., 2002). Le signalosome produit permet d'aboutir à terme aux fonctions effectrices des lymphocytes NK comme la cytotoxicité ou la sécrétion de cytokines (Chiesa et al., 2005; Vivier et al., 2004).

La voie cytotoxique emprunte deux voies de signalisations principales : la voie PI3K-ERK2 et la voie PLC $\gamma$ -JNK (Chen et al., 2007b; Li et al., 2008) qui vont toutes deux aboutir à l'étape

(5) et l'organisation des microtubules. La polarisation des MTOC permet d'amener les granules cytotoxiques (granzyme et perforine) au niveau du cSMAC de l'aNKIS.

Les dernières étapes du processus synaptique sont encore mal connues. On sait que chaque lymphocyte NK possède un stock de granules lytiques déjà disponible. Ce stock se retrouve localisé au niveau du cSMAC suite à la polarisation des MTOC. En outre, le contact avec la cellule cible engendre une synthèse rapide *de novo* de lysosomes et une activation de leur exocytose dépendante du  $Ca^{2+}$  (Liu et al., 2005). Cette exocytose requiert les fonctions conjointes des protéines de réorganisation du cytosquelette d'actine (WASp, WIP)(Orange et al., 2003; Orange et al., 2002) et des microtubules (CIP4, myosin IIA, AP3, Rab7) (Andzelm et al., 2007; Banerjee et al., 2007; Casey et al., 2007) puisque l'abrogation de ces protéines clés prévient la polarisation et le transport des granules. Certaines pathologies ont pu mettre en avant le rôle fondamental de ces protéines. On peut citer les patients atteints par le syndrome de Hermansky–Pudlak caractérisé par une mutation dans la sous-unité  $\beta 3A$  d'AP-3, une protéine adaptatrice interagissant avec la clathrine pour le transport des lysosomes. Ces patients souffrent d'une cytotoxicité réduite de leur NK et CTL (Clark et al., 2003; Fontana et al., 2006).

L'exocytose des granules cytotoxiques n'a pas été beaucoup étudiée mais il semblerait que les protéines impliquées dans ce mécanisme soient similaires à celles présentes chez les lymphocytes T. Ainsi, on peut citer l'implication de Rab27a et Munc13-4 permettant l'ancrage des granules à la membrane cellulaire (Bossi and Griffiths, 2005; Menasche et al., 2000). Les lymphocytes NK provenant de patients déficients pour Muc13-4 (Marcenaro et al., 2006) présentent de fortes déficiences de dégranulation de leur cellules cytotoxiques (NK et CTL). La fusion des granules ancrées à la membrane est assurée par les protéines de la famille SNARE (notamment VAMP7 et la syntaxin 11) (Arneson et al., 2007; Feldmann et al., 2003;

Marcet-Palacios et al., 2008). La perforine peut agir après fusion des granules cytotoxiques avec la membrane et libération de leur contenu dans l'espace intercellulaire. Initialement, il était admis que le rôle de la perforine était de former des pores dans la membrane cellulaire de la cible (Voskoboinik et al., 2006). Pourtant des données récentes suggèrent que le mécanisme d'internalisation est plus complexe et pourrait impliquer une interaction entre les granules via le granzyme B et le récepteur au mannose 6-phosphate (Buzza and Bird, 2006). L'ensemble protéique entrerait dans la cellule sous forme de vésicule et la perforine libérerait le granzyme B, lui permettant d'agir au sein de la cellule. Les granzymes, des serines protéases, agissent en clivant les caspases (plus particulièrement la caspase-3) et la protéine Bid, déclenchant la mort cellulaire programmée (apoptose) de la cellule. Après déploiement de ces fonctions effectrices, la cellule NK se détache de sa cible et l'aNKIS se dissocie. Cette étape est la moins décrite mais on sait que le détachement de la cellule NK fait intervenir la formation de tubes membranaires appelées nanotubes (Onfelt et al., 2004). A noter que cette dernière étape est associée à une capture active de fragment de la membrane cellulaire de la cible par le lymphocyte NK. Cette étape dépend de l'ATP, de la PKC, du flux calcique, de la polymérisation d'actine et pourrait impliquer la GTPase Dynamin 2. Cette récupération de membrane et de vésicules perdues au cours de l'exocytose permet de rétablir une intégrité de la membrane du lymphocyte NK (Arneson et al., 2008; Tabiasco et al., 2002).

---

### 1.6.2 iNKIS

Par opposition avec l'aNKIS, la mise en place d'une iNKIS implique l'interaction entre une cellule exprimant normalement le CMH I et le lymphocyte NK. La synapse qui est produite a donc pour but principal de prévenir toute action délétère du lymphocyte NK et sa structure est fondamentalement différente de l'aNKIS. L'iNKIS ne fait intervenir aucun réarrangement du cytosquelette et est indépendant de l'ATP (Fassett et al., 2001).

Après contact avec la cible, les récepteurs inhibiteurs associés à leurs ligands vont spontanément se rassembler au niveau de l'iNKIS (Vyas et al., 2004). La simple fixation de ligands aux récepteurs inhibiteurs (KIR chez l'homme) permet cette concentration à l'iNKIS et ne fait intervenir aucune consommation d'ATP. Il semblerait que le  $Zn^{2+}$  puisse produire une multidimerisation des KIR, proposant un mécanisme de déplacement indépendant de l'ATP dans ce contexte (Vales-Gomez et al., 2001). Le nombre de récepteurs inhibiteurs présents à l'iNKIS augmente et atteint une valeur constante et proportionnelle au total de protéines exprimées par la cellule NK. Initialement et par analogie avec les structures de l'aNKIS, on localise les récepteurs inhibiteurs dans la cSMIC (central supramolecular inhibitory cluster) alors que les molécules d'adhérences se placent en périphérie, pSMIC (peripheral supramolecular inhibitory cluster) (Carlin et al., 2001). Par la suite, les récepteurs inhibiteurs se dispersent au sein de l'iNKIS et forment des groupes distincts alors que LFA-1 et les autres molécules d'adhérences se réorganisent au centre de l'iNKIS (Treanor et al., 2006). Un seuil d'expression des molécules du CMH I par le cible, unique pour chaque lymphocyte NK, doit être atteint pour engager les récepteurs inhibiteurs requis et assurer une inhibition de la cytotoxicité NK (Almeida and Davis, 2006). Ce seuil atteint, le signal inhibiteur transmis est suffisant pour dominer tout signal potentiellement activateur présent et supprimer les fonctions des lymphocytes NK à l'encontre de la cible (Kabat et al., 2002; Watzl et al., 2000).

La reconnaissance de leurs ligands par les KIR et CD94/NKG2A a pour conséquence la phosphorylation rapide des séquences ITIM associées (Faure et al., 2003; Krzewski et al., 2006) et le recrutement des tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 au niveau de la zone cSMIC (Masilamani et al., 2006; Yusa and Campbell, 2003). Il s'en suit une déphosphorylation sélective des récepteurs activateurs, des protéines de signalisation telles que vav-1 (Stebbins et al., 2003) et une suppression des réarrangements du cytosquelette et

des molécules d'adhérences (Burshtyn et al., 2000; Stebbins et al., 2003; Yusa and Campbell, 2003). La conséquence directe de cette déphosphorylation massive est l'exclusion des radeaux lipidiques de l'iNKIS (Lou et al., 2000), l'abrogation du signalosome et de la polymérisation du cytosquelette d'actine.

## 1.7 COOPERATION ENTRE LES LYMPHOCYTE NK ET L'IMMUNITÉ

Les cellules NK ont été initialement décrites comme étant des lymphocytes produisant une première ligne de défense contre les agressions virales, bactériennes et tumorales pendant l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative efficace. Pourtant, il est maintenant admis que leur rôle au sein de l'immunité ne se résume pas à une simple question de vie ou de mort pour leur cible. L'étude des SI formées par les lymphocytes NK a révélé que l'interaction de ces cellules avec certains types cellulaires de l'immunité aboutissait à des signalosomes aux fonctions plus complexes. A ce titre, les lymphocytes NK peuvent établir des interactions régulatrices avec les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T.

### 1.7.1 INTERACTION ENTRE LYMPHOCYTE NK ET CELLULES DENDRITIQUES

Les cellules dendritiques (DC) sont les principales CPA du système immunitaire. Elles jouent un rôle de sentinelle nécessaire à l'initiation et la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Elles peuvent produire des cytokines inflammatoires notamment l'IFN- $\alpha$ . Elles sont impliquées dans la maturation des lymphocytes B et l'orientation des lymphocytes T naïfs vers des profils matures et fonctionnels (Th1, Th2, Th17). Au cours de cette maturation, des facteurs cellulaires et environnementaux conditionnent l'issue de l'interaction entre DC-T ou DC-B.

De récentes données démontrent que les DC peuvent aussi entrer en interaction avec les lymphocytes NK au niveau des tissus lymphoïdes secondaires et des sites inflammatoires (Bajenoff et al., 2006; Buentke et al., 2002). Les DC peuvent activer les NK indirectement par la sécrétion de cytokines (interférons de type I, IL-12, IL-15, IL-18) ou directement, via des contacts cellulaires et la formation d'un SI particulière. La synapse établie entre un lymphocyte NK et une DC (DC-NK IS) diffère des synapses aNKIS et iNKIS décrites précédemment. En effet, l'adhérence initiale entre les deux cellules ne fait pas intervenir LFA-1 mais implique une interaction entre DC-SIGN, LFA-3 et CX3CL1 présents sur les DC avec les protéines ICAM et CX3CL1 exprimées par le lymphocyte NK (Borg et al., 2004; Brilot et al., 2007; Pallandre et al., 2008). La formation de la synapse implique un afflux calcique chez le lymphocyte NK, suivi par un renforcement des contacts cellulaires, une accumulation des radeaux lipidiques et une polymérisation du cytosquelette d'actine au centre de la DC-NK IS (Brilot et al., 2007). Par opposition à la iNKIS, les récepteurs inhibiteurs KIR et CD94/NKG2A s'accumulent au centre de l'IS, un phénomène dépendant de CX3CL1, sans pour autant prévenir la polymérisation d'actine et la relocalisation des radeaux lipidiques. L'activation des NK fait intervenir les récepteurs NKp30 et NKp46. Après formation de la DC-NK IS, il y a migration des MTOC de la DC au niveau de la DC-NK IS permettant ainsi l'exocytose des interleukines régulatrices (Ferlazzo et al., 2004a) (IL-12, IL-15, IL-18, IFN Type I) et la stimulation des lymphocytes NK (Semino et al., 2005). On peut identifier la DC-NK IS comme une structure empruntant les caractéristiques des aNKIS et iNKIS.

L'interaction DC-NK permet une activation bidirectionnelle des cellules. L'IL-12 favorise la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et la prolifération des lymphocytes NK (Orange and Biron, 1996a, b) tandis que l'IL-15 est déterminante pour leur survie (Brilot et al., 2007; Lucas et al., 2007). Enfin, les IFN de type I contribuent à l'amélioration de la cytotoxicité NK (Gerosa et al., 2005). L'activation des lymphocytes NK est bénéficiaire pour les DC puisque leur production de

TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$  et les contacts cellulaires permettent la maturation des DC (expression de CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CCR7 et une sécrétion d'IL-12 accrue) (Gerosa et al., 2002; Piccioli et al., 2002). Dans les organes lymphoïdes secondaires, la boucle d'activation DC/NK se situe dans les mêmes niches anatomiques que l'activation et la maturation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et la forte production d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  résultante peut conduire à une réponse T Th1 efficace (Adam et al., 2005). Il a été aussi montré un rôle particulier de l'IFN- $\alpha$  produit par les DC plasmacytoïdes (pDC) aux sites inflammatoires comme intermédiaire de l'activation des cellules NK. Celles-ci peuvent ensuite poursuivre la maturation des DC conventionnelles qui vont initier des réponses T CD8<sup>+</sup> efficaces (Liu et al., 2008; Mailliard et al., 2003; Tosi et al., 2004).

Les NK activés peuvent aussi lyser les DC immatures par la formation d'ANKIS lytique et selon un mécanisme dépendant de NKp30, NKp46 et DNAM-1 (Ferlazzo et al., 2002; Pende et al., 2006; Spaggiari et al., 2001). Ce mécanisme est contourné par les DC matures puisqu'elles expriment une plus grande quantité de HLA-E qui intervient dans la répression des fonctions NK dépendantes du CD94/NKG2A (Della Chiesa et al., 2003). Cette destruction spécifique des DC immatures permet de limiter leur recrutement dans les organes lymphoïdes secondaires pouvant orienter vers une réponse immunitaire tolérogène (Ferlazzo et al., 2002; Pende et al., 2006; Spaggiari et al., 2001).

## 1.7.2 INTERACTION ENTRE LES LYMPHOCYTES NK ET LES MACROPHAGES

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée qui participent au nettoyage des débris cellulaires (apoptotique et nécrotique) par leur propriété de phagocytose. Ils sont capables de produire des cytokines immuno-modulatrices (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ 1), participent à la réponse anti-bactérienne et peuvent contribuer à l'activation des lymphocytes T mémoires

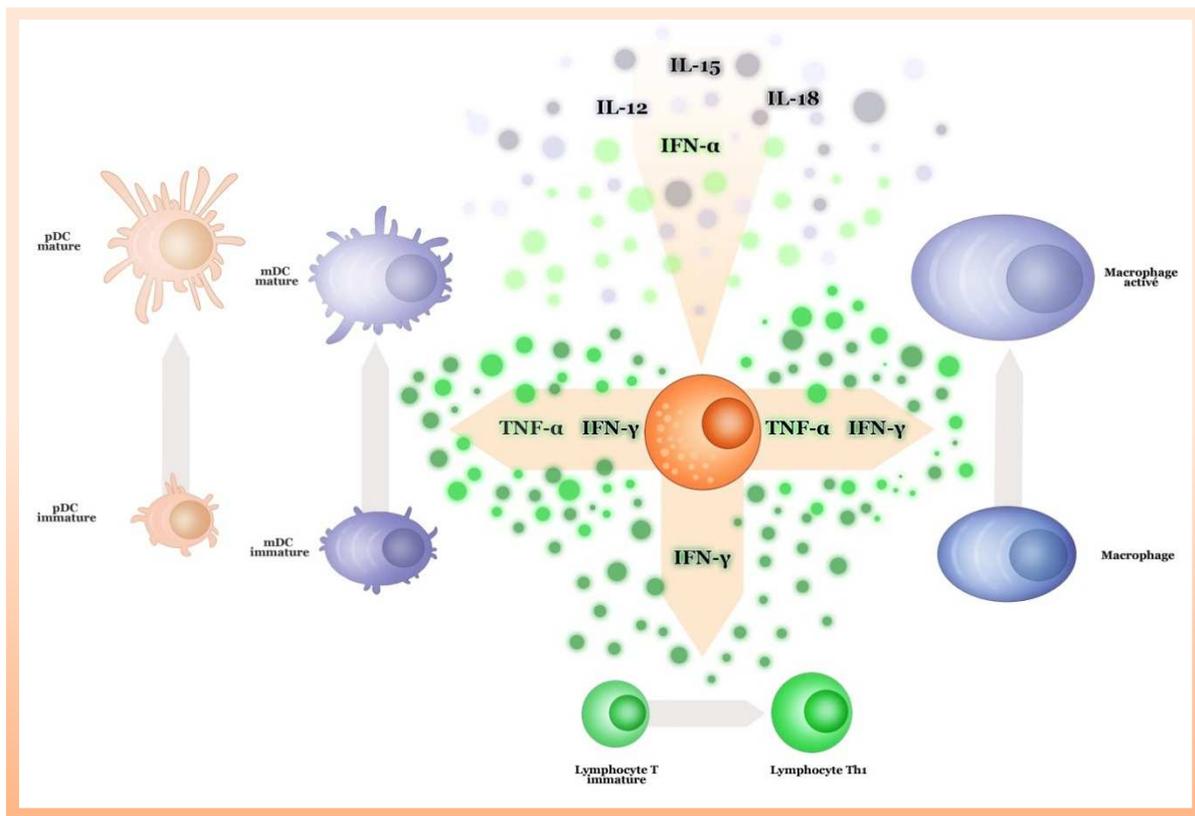
grâce à leur capacité à présenter des antigènes mineurs. Récemment des publications suggèrent une interaction entre les macrophages et les cellules NK. Cette interaction nécessite la formation d'une synapse M-NK IS particulière. Il y a accumulation du récepteur 2B4 et augmentation modérée de la F-actine à l'interface M-NK IS (Nedvetzki et al., 2007). Comme c'est le cas pour la DC-NK IS, la conséquence de la M-NK IS est une stimulation de la prolifération cellulaire, de la sécrétion cytokinique et de la cytotoxicité du lymphocyte NK. Il est à noter que l'interaction entre un NK et un macrophage fortement activé par de grandes doses de LPS tend à produire une aNKIS et la lyse du macrophage par une voie dépendante de NKG2D (Nedvetzki et al., 2007). Cela indiquerait un rôle régulateur des NK dans la prévention des désordres inflammatoires. Cette observation est confortée par une co-localisation des lymphocytes NK et des macrophages au niveau de la rate ou des organes périphériques (Gregoire et al., 2007).

### 1.7.3 INTERACTION ENTRE LES LYMPHOCYTES NK ET LYMPHOCYTES T ET B

En plus de leurs fonctions régulatrices des cellules myéloïdes, les cellules NK sont capables de gérer l'orientation des lymphocytes T au cours d'une réponse immunitaire. Par exemple, lors d'une infection bactérienne expérimentale à *Leishmania major*, leur forte production d'IFN- $\gamma$  favorise l'orientation Th1 des lymphocytes T présents dans les organes lymphoïdes secondaires (Adam et al., 2005; Bajenoff et al., 2006; Liu et al., 2008; Mailliard et al., 2003; Tosi et al., 2004). En outre, les cellules NK peuvent contribuer à la résolution d'une réponse immunitaire. Les travaux de Lu et al. ont montré qu'une activation des lymphocytes T était corrélée à une expression accrue des ligands de NKG2D, les rendant sensibles à la lyse des lymphocytes NK. Enfin, ils peuvent contribuer à la maturation des lymphocytes B et la

commutation de classe d'anticorps associés aux réponses immunes de type humorale (Gao et al., 2008).

Le rôle complexe des lymphocytes NK au sein de l'immunité est résumé dans le schéma suivant (Figure 10).



**Figure 10 – Rôles des lymphocytes NK au sein du système immunitaire.**

Les cellules NK jouent un rôle important dans la maturation des cellules immunitaires par leur production de cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ . Elles favorisent la maturation des cellules dendritiques myéloïdes qui en retour produisent de l'IL-12, de l'IL-15 et de l'IL-18 qui stimulent l'activation des cellules NK. La boucle d'amplification immunitaire permet par la suite le développement d'une réponse immunitaire Th1 efficace. Les cellules NK sont capables d'activer les macrophages et de stimuler leur capacité à phagocyter. Cette interaction peut aussi activer les cellules NK en retour. Enfin, les cellules NK sont capables de lyser les cellules immatures (mDC immature, lymphocytes T immatures) et les macrophages suractivés afin de garantir une réponse immunitaire rapide et efficace.

## 1.8 ROLE DES LYMPHOCYTES NK DANS LA DEFENSE DE L'ORGANISME

La grande variété de récepteurs exprimés par les lymphocytes NK leur permet de rapidement percevoir l'intrusion de pathogènes d'origine virale et bactérienne et de détruire les cellules infectées. Par la suite, leur interaction privilégiée avec les cellules dendritiques conditionne l'initiation d'une réponse immunitaire efficace.

Le rôle des lymphocytes NK dans les infections virales a été rapidement découvert puisque ces cellules lymphocytaires sont retrouvées activées (cytotoxicité accrue *in vitro*) après infection par un large panel de virus chez la souris (Lodoen and Lanier, 2005). Si, les inductions d'IFN de type I et d'IL-15 observées au cours d'infections virales peuvent expliquer la présence de NK stimulés *in vivo* (Zhang et al., 1998), les NK peuvent aussi reconnaître directement des pathogènes viraux par leurs expressions de TLR et de NCR. Les études réalisées sur le modèle du cytomégalo virus murin (MCMV) ont permis de mieux comprendre la réponse NK lors d'infections virales. L'infection par le MCMV active directement les cellules NK *in vivo* et le contrôle de la réplication du MCMV est assuré par ces lymphocytes (Bukowski et al., 1983; Quinnan and Manischewitz, 1979). Les études suivantes ont montré que l'infection par le MCMV implique l'activation d'une population NK exprimant le récepteur Ly49H (Dokun et al., 2001) et reconnaissant la glycoprotéine virale m157 exprimée précocement par les cellules infectées par le MCMV (Arase et al., 2002; Smith et al., 2002). L'activation des lymphocytes NK Ly49H<sup>+</sup> aboutit à une activation globale des lymphocytes NK. Il s'en suit un recrutement plus important des lymphocytes NK au site de l'infection (Hokeness et al., 2005; Salazar-Mather et al., 1998) grâce à la production de MIP1 $\alpha$  par les macrophages. La production d'IFN- $\alpha$  par les DC et les pDC (Andrews et al., 2003; Dalod et al., 2003) amplifie les fonctions NK. Enfin, il a été montré que l'activation des lymphocytes NK Ly49H<sup>+</sup> permet de contrôler la destruction des DC suite à l'infection chez

des souris C57BL/6 (Andrews et al., 2003). Les NK activés peuvent ensuite favoriser le développement d'une réponse T adaptative comme décrite précédemment (Robbins et al., 2007).

Un rôle protecteur contre le cytomégalo virus humain (HCMV) existe et semble faire intervenir les cellules NK exprimant CD94/NKG2C par une reconnaissance d'UL40 (Biron et al., 1989; Guma et al., 2006). Cependant, la protéine virale UL40 peut aussi se fixer au HLA-E et engager le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, prévenant l'activation des lymphocytes NK (Tomasec et al., 2000; Ulbrecht et al., 2000; Wang et al., 2002). De plus, la protéine du HCMV UL18 peut interagir avec le récepteur inhibiteur ILT2, fournissant une preuve supplémentaire du contrôle des lymphocytes NK par le HCMV. Le rôle des NK dans l'infection au HCMV semble donc plus complexe et nécessitera des études complémentaires pour déterminer les facteurs activateurs en dépit des nombreuses voies d'inhibition observées.

L'importance des lymphocytes NK dans les infections virales au CMV est d'autre part soulignée par les mécanismes d'évasion variés mis en œuvre pour contourner leurs fonctions. En plus de son interaction avec Ly49H, m157 peut aussi s'associer à Ly49I, un récepteur inhibiteur des lymphocytes NK (Arase et al., 2002). Ly49I n'est exprimé que par une sous-population NK dans certaines souches de souris (129/J) et pourrait expliquer les différences de sensibilités observées chez ces souches de souris. Chez l'homme, UL18 interagit avec le récepteur inhibiteur ILT2 pour le contrôle des réponses immunitaires impliquant les cellules NK. En outre, le virus MCMV a développé de nombreux mécanismes pour bloquer les NKG2DL et leur expression membranaire. La protéine m152 inhibe l'expression de Rae1 (Lodoen et al., 2003), m155 et m138 diminuent l'expression de H60 (Lenac et al., 2006; Lodoen et al., 2004) et MULT1 est ciblé par m145 et m138 (Krmpotic et al., 2002; Lenac et al., 2006). Chez l'homme, la protéine UL16 du HCMV cible spécifiquement MICB, ULBP1,

ULBP2 et RAET1G et UL141 s'associe à CD155 pour catalyser leurs dégradations et prévenir leurs expressions membranaires (Bacon et al., 2004; Cosman et al., 2001; Dunn et al., 2003). Par analogie, des données plus récentes citent les miRNA exprimés par le MCMV (miRNA UL112) qui peuvent cibler la protéine MICB dans les cellules infectées pour restreindre sa présentation membranaire (Stern-Ginossar et al., 2007).

Si l'étude du rôle des lymphocytes NK dans les infections au CMV est très fournie, leur rôle a également été démontré dans d'autres infections. A titre d'exemple, le premier patient présentant une déficience en lymphocytes NK souffrait non seulement d'infections à l'HCMV mais aussi de HSV et de VZV (Biron et al., 1989). De nombreuses données expérimentales confirment une activation des cellules NK lors de l'infection au HSV-1 sans préciser si cela est dû à une reconnaissance directe des protéines issues du virus. Plus récemment, une petite fille de 2 ans subissant des infections répétées au VZV est décédée des suites de cette maladie. Des études complémentaires ont montré que cette patiente souffrait d'une déficience caractéristique en lymphocytes NK (Etzioni et al., 2005). L'infection par le virus de l'EBV peut être contenue par les cellules NK dans certaines conditions et une réactivation latente de l'EBV dans des lymphocytes B transformés les rends susceptibles à la lyse NK par un mécanisme dépendant de DNAM1 et NKG2D (Pappworth et al., 2007). Des études épidémiologiques ont révélé un rôle potentiellement protecteur des récepteurs KIR activateurs KIR2DS1 et KIR3DS1 chez les patients atteints de lymphomes Hodgkiniens associés à l'EBV (Besson et al., 2007). Enfin, les virus de type *Influenza* sont aussi reconnus par les lymphocytes NK par des mécanismes impliquant NKp46 et NKG2D (Draghi et al., 2007; Gazit et al., 2006).

Chez l'homme, plusieurs études de cohortes ont montré une relation entre le polymorphisme des KIR et l'évolution de l'infection par le virus de l'hépatite C (HCV) et par le virus du VIH

(Khakoo et al., 2004; Vilarinho et al., 2007). Khakoo et coll. ont observé que les patients possédant les protéines de HLA-C de groupe 1 et le récepteur KIR2DL3 pouvaient contenir plus efficacement l'infection. Si le mécanisme d'action n'est pas connu, l'hypothèse serait que l'expression d'un KIR inhibiteur de faible affinité pour son ligand résulterait en une réponse plus efficace des NK contre le HCV. En ce qui concerne le virus du VIH, les individus exprimant les allèles HLA-Bw4 montrent un retard dans l'initiation des pathologies associées au VIH (Flores-Villanueva et al., 2001). Cette protection est augmentée de manière significative lorsque les patients possèdent certaines allèles de KIR3DL1 (KIR3DL1 ou KIR3DS1) et les personnes présentant les haplotypes KIR3DS1/HLA-Bw4-I80 sont plus protégées contre les infections opportunistes conséquentes au développement du SIDA (Carr et al., 2007; Martin et al., 2007; Trundley et al., 2007).

En marge des propriétés antivirales attribuées aux lymphocytes NK, un certain nombre d'études a démontré que ces cellules étaient aussi activées et parfois jouaient un rôle protecteur dans les infections liées aux microorganismes (bactéries, champignons, parasites). Si aucune étude ne souligne une activation directe par des ligands de ces origines, on sait que certains NCR peuvent se lier à des motifs bactériens comme la vimentine associée à une infection aux mycobactéries et reconnue par NKp44 et NKp46 (Esin et al., 2008; Garg et al., 2006). D'autre part, l'expression des TLR2, TLR4, TLR5 et TLR9 par les lymphocytes NK leur permet d'assurer une production d'IFN- $\gamma$  critique pour la réponse immunitaire lors des infections bactériennes par *Legionella pneumophila* (Sporri et al., 2006), *Listeria monocytogenes* (Teixeira and Kaufmann, 1994) ou encore *Mycobacterium tuberculosis* (Feng et al., 2006; Junqueira-Kipnis et al., 2003). Enfin, les NK peuvent aussi contribuer à la réponse contre les parasites comme il a été par exemple dans la réponse immunitaire observée chez les patients atteints de Leishmaniose (Liese et al., 2008). Au cours de cette infection, la forte production d'IL-12 fournie par les mDC conditionne l'activation des lymphocytes NK,

leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  et le contrôle de la propagation de *Leishmania Major* (Liese et al., 2008). La Leishmaniose n'est qu'un exemple des fonctions antiparasitaires des lymphocytes NK et depuis, les cellules NK ont été impliquées dans les infections à *Toxoplasma gondii* (Sher et al., 1993) ou encore *Trypanosoma cruzi* (Duthie and Kahn, 2005) en détruisant spécifiquement les cellules infectées tout en préservant les organes sensibles comme le foie (Duthie and Kahn, 2005; Roland et al., 2006).

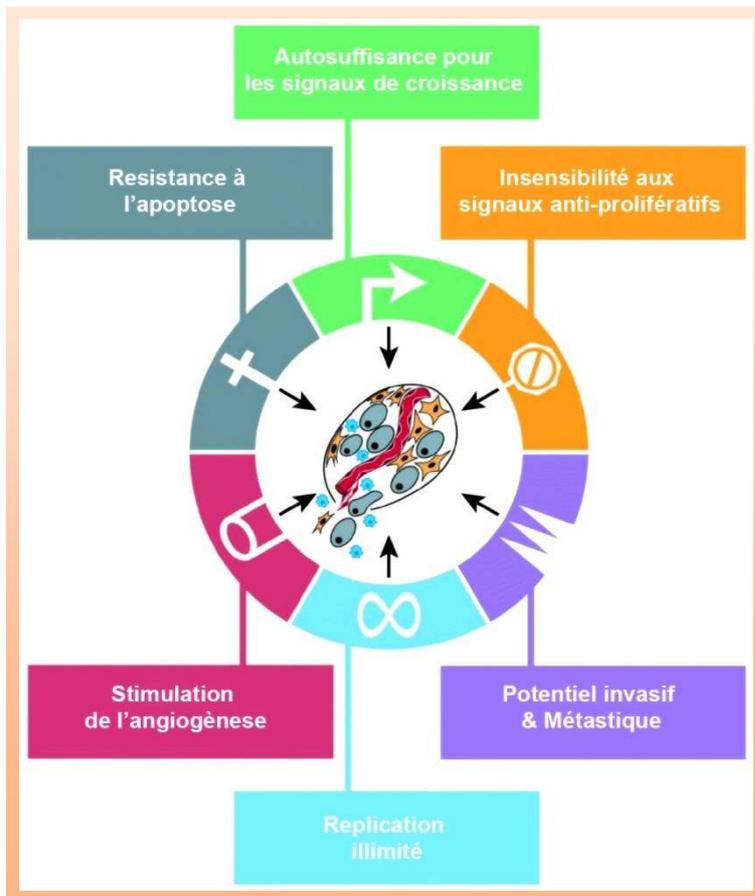
Le dernier rôle des NK dans la défense de l'organisme a fait resurgir un concept émis précocement en immunologie : L'immunosurveillance. En effet, les études récentes sur ces cellules immunitaires se focalisent plus particulièrement sur leur faculté à contenir le développement tumoral *de novo* chez des individus sains.

## 2 ONCOGENESE ET IMMUNOSURVEILLANCE DES CANCERS

### 2.1 GENERALITES SUR L'ONCOGENESE

Si l'étude des mécanismes d'oncogénèse a produit de nombreuses données au cours des 30 dernières années, il aura fallu attendre le début des années 2000 pour clairement établir les origines de cette maladie et proposer un modèle théorique. Comme décrit par Hanahan et Weinberg, la tumorigénèse est un processus multi-étapes d'altérations génétiques stochastiques conduisant à la production de dérivés malins à partir de cellules saines (Hanahan and Weinberg, 2000). Certaines observations supportent cette théorie comme l'incidence de cancers augmentant avec l'âge du patient ou encore la présence de mutations répétées au niveau des chromosomes des cellules cancéreuses (Kinzler and Vogelstein, 1996). Collectivement, ces observations suggèrent que le cancer est une conversion progressive d'une cellule saine en une cellule maligne arborant des résistances et des avantages prolifératifs qui favorisent son évolution incontrôlable.

Six « piliers » de la tumorigenèse conditionnant la production de cellules tumorales ont été présentés. Ces points essentiels sont des modifications critiques de la physiologie cellulaire permettant d’outrepasser les mécanismes de contrôle mis en place par l’organisme. Les points clés sont (1) l’autosuffisance par rapport aux signaux de croissance, (2) l’insensibilité aux facteurs antiprolifératifs, (3) la résistance à l’apoptose, (4) une répllication illimitée, (5) la stimulation de l’angiogénèse et (6) l’obtention d’un potentiel invasif métastatique (Figure 11).



**Figure 11 – Piliers du cancer.**

Il a été décrit 6 points critiques dans la modification physiologique cellulaire entraînant la production de cellules tumorales. On compte les mécanismes cellulaires influençant la résistance à l’apoptose, l’autosuffisance pour les signaux de croissance, l’insensibilité aux signaux antiprolifératifs, l’augmentation du potentiel invasif et métastatique, la stimulation de l’angiogénèse et enfin un potentiel de répllication illimité. (Hanahan and Weinberg, 2000).

En accord avec ces 6 points critiques, on distingue les gènes favorisant (oncogène) ou réprimant (suppresseur de tumeur) le développement tumoral. Ainsi, l’évolution cancéreuse est la conséquence de mutations stimulant l’expression d’oncogènes et l’inactivation de gènes suppresseurs. Nous ne décrivons que brièvement les étapes clés de la progression tumorale (i.e. initiation, promotion, progression et invasion tumorale) pour donner les éléments

nécessaires à la compréhension du sujet. L'initiation tumorale est déclenchée par un facteur promoteur, qu'il soit d'origine génétique, physique ou chimique. La modification génétique engendre une faculté accrue de prolifération due au point (1) ou (2) cités précédemment. A titre d'exemple, on peut citer la production excessive de PDGF (Platelet-derived growth factor) et de TGF- $\alpha$  (Wang et al., 2009b) ou encore l'inactivation de la protéine du rétinoblastome (pRb) qui contrôle la progression de cycle de la phase G1 à S (Giacinti and Giordano, 2006).

La phase de promotion est caractérisée par l'accumulation de modifications génétiques qui aboutissent à l'immortalisation de la cellule tumorale. L'évasion à l'apoptose (3) peut être acquise, entre autres, par les mutations inactivant la protéine p53. Cette protéine contrôle l'entrée en phase d'apoptose des cellules dont les dommages subis sont irréversibles (lésions ADN, anomalies dans le cycle cellulaire, etc...). Une perte de p53 favorise l'accumulation d'anomalies génétiques, critiques à la phase de promotion tumorale. La sénescence cellulaire est aussi affectée au cours de la promotion tumorale et on peut observer une forte activité enzymatique de la télomérase (4) contribuant à la production d'une cellule immortelle. Cette prolifération incontrôlée nécessite un apport continu de nutriments et d'oxygène soutenu par une vascularisation excessive de la tumeur. Par conséquent, de nombreux facteurs pro-angiogéniques sont surexprimés par les cellules tumorales (VEGF, FGF). Cet élément clé a souligné l'importance d'envisager la tumeur comme un mélange cellulaire hétérogène en interaction avec l'environnement et non une structure composée uniquement de cellules tumorales. La phase de progression tumorale est caractérisée par l'acquisition d'un phénotype malin, c'est-à-dire la propriété invasive de la tumeur. La perte de molécules d'adhérence (ex : molécules de la famille CAM comme la E-cadherine et les intégrines), déstabilisant la cohésion intercellulaire, favorise le détachement de la matrice extracellulaire (Christofori and Semb, 1999). Cette capacité à se détacher de la tumeur primaire et à se déplacer pour former

des tumeurs secondaires à distance (métastases) est responsable de la majorité des morts relatives au cancer.

Si le but des dernières années d'études étaient d'élucider les mécanismes cellulaires communs agissant de concert pour promouvoir le développement tumorale, il apparait maintenant évident que la compréhension de l'oncogenèse nécessite l'étude des facteurs micro-environnementaux. Ainsi, le défi de l'oncologie actuelle est l'étude des dialogues entre tumeur et cellules stromales ou encore entre tumeur et cellules immunitaires. A cet effet, l'immunologie des tumeurs s'attache à caractériser deux concepts essentiels : le contrôle exercé par les cellules immunitaires sur la tumeur en développement ou immunosurveillance et les mécanismes d'échappement immunitaire engagés par la cellule tumorale pour assurer sa survie.

---

## 2.2 PRINCIPE D'IMMUNOSURVEILLANCE ET D'IMMUNOEDITION

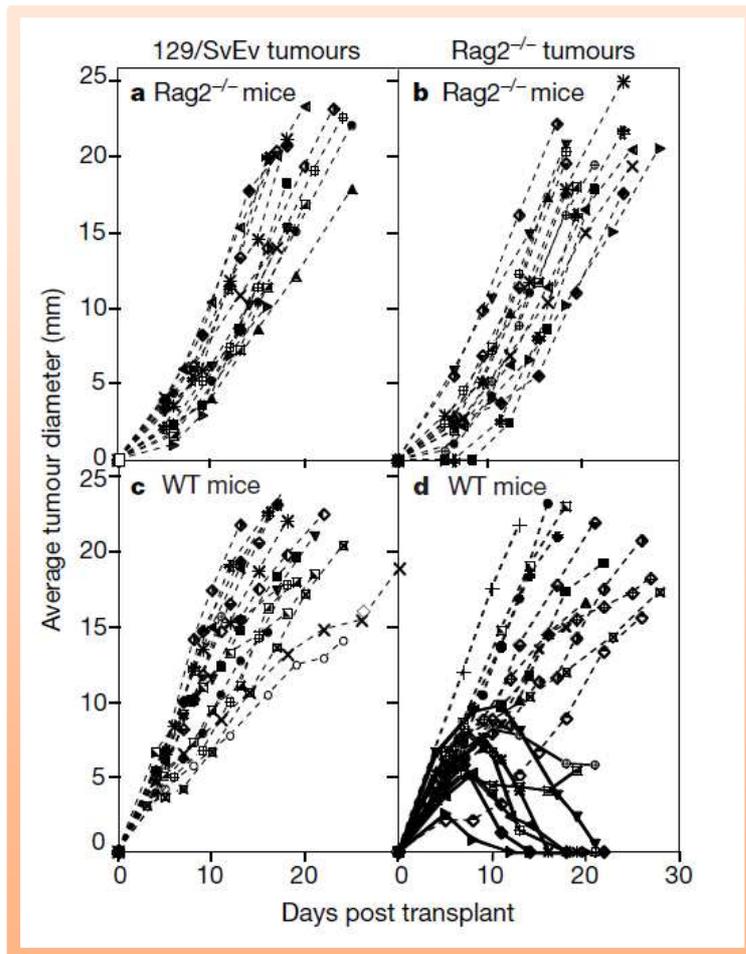
Le concept d'immunosurveillance stipulant que le système immunitaire peut reconnaître et éliminer les tumeurs en développement a été très précocement émis. Dès 1909, Paul Ehrlich suggéra que le système immunitaire pouvait reconnaître et réprimer la croissance tumorale des carcinomes (Silverstein, 2002). Le principe fut oublié puis repris 50 ans plus tard par Burnet et Thomas et effectivement nommé immunosurveillance (Burnet, 1970). Leur étude, inspirée par la compréhension accrue des mécanismes de rejet de greffe, tenta d'évaluer le rôle des lymphocytes dans le rejet de tumeur induite par le carcinogène methylcholanthrene (MCA). Cependant, lorsque l'expérience fut initiée par traitement dans des souris nude CBA/H, aucunes données convaincantes ne furent obtenues. Plus précisément, les souris nude ne développèrent pas plus de tumeurs spontanées ou induites par le MCA que les souris contrôles. Rétrospectivement, l'utilisation de souris nude de fond CBA/H présente un biais important. Premièrement, ces souris nude sont des modèles imparfaits de déficience

immunitaire puisqu'elles produisent des quantités faibles mais détectables de lymphocytes T et possèdent des cellules NK en quantité normale. Deuxièmement, les souris CBA/H possèdent l'isoforme de l'enzyme aryl-hydroxylase la plus active, favorisant un la catalyse du MCA en sa forme carcinogène plus efficacement. La transformation tumorale dépendante du MCA chez les souris CBA/H pourrait donc être suffisamment efficace, masquant le rôle de l'immunosurveillance.

Par conséquent, la validité de ce concept n'a pu être établi que tardivement, avec l'avènement des modèles murins déficients et la production d'anticorps monoclonaux hautement spécifiques à l'encontre des éléments clés de l'immunité. Au cours des dernières années, le concept d'immunosurveillance a évolué et il a été démontré que s'il était capable de protéger l'hôte contre le développement tumoral, le système immunitaire pouvait aussi indirectement promouvoir le développement tumoral en éliminant les cellules les plus sensibles tout en préservant et favorisant l'émergence les clones résistant. Le terme immunosurveillance a donc été renommé immunoédition afin de rendre compte de cette dualité (Dunn et al., 2002). Le processus d'immunoédition est composé de trois étapes clés (nommées les trois E) : Elimination, Equilibre puis Echappement. La première étape a été largement décrite précédemment et supporte l'idée selon laquelle le système immunitaire va déclencher un certain nombre de mécanismes pour enrayer l'évolution des cellules tumorales. Pourtant ce système n'est pas infaillible et conduit inévitablement à la seconde étape, l'étape d'équilibre.

Au cours de cette étape, les cellules tumorales ayant survécues face aux défenses immunitaires de l'hôte entrent dans une dynamique d'interaction avec les lymphocytes (T, NK) au sein d'un environnement inflammatoire résultant des nombreuses cytokines produites au cours de la première phase. Comme il a été démontré dans de nombreuses études (Kaplan et al., 1998), cette pression d'élimination exercée par le système immunitaire favorise

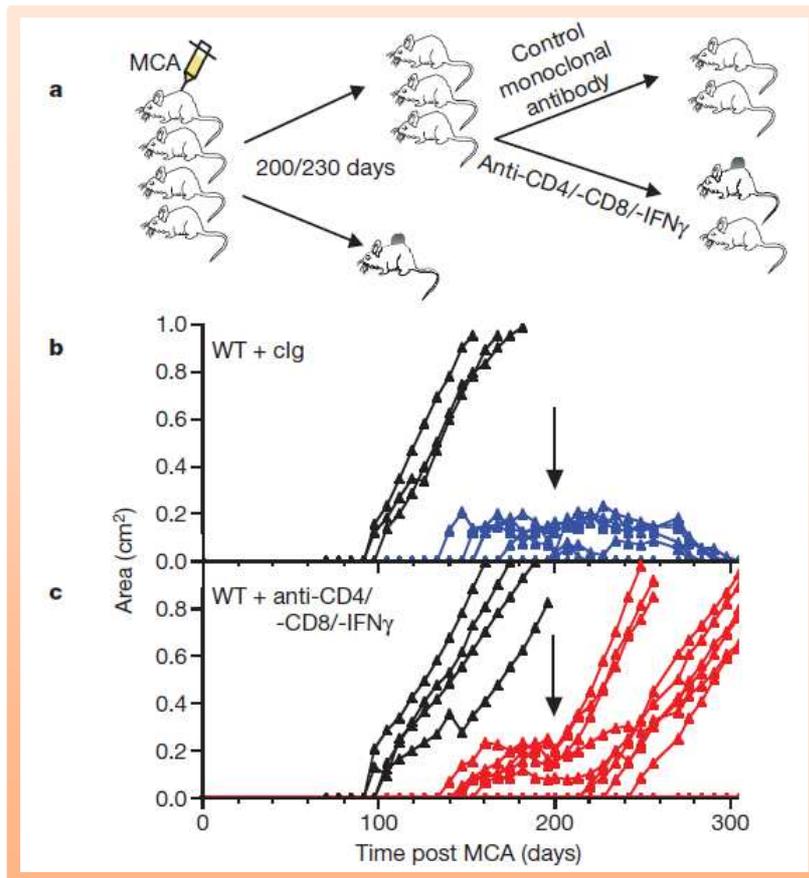
également l'instabilité génétique et l'émergence de clones mutants moins immunogéniques et ayant un phénotype agressif présentant des résistances aux attaques immunitaires (Koebel et al., 2007; Swann et al., 2008). L'équipe de Schreiber a fortement contribué à la description de cet état d'équilibre. En 2001, une étude sur l'immunogénicité des sarcomes induits par le MCA issus de souris sauvages ou  $RAG2^{-/-}$  a permis de clairement impliquer le rôle de l'immunité dans la production de tumeur moins immunogénique (Figure 12). Lorsque les tumeurs issues des souris  $RAG2^{-/-}$  ou 129/SvEv sauvages étaient injectées dans des souris  $RAG2^{-/-}$  (Figure 12a/b) la cinétique de croissance tumorale était similaire dans les deux groupes. Lorsque ces mêmes cellules tumorales étaient injectées dans des souris 129/SvEv sauvages (Figure 12c), 17/17 tumeurs issues des souris 129/SvEv poussèrent progressivement pour former des tumeurs. Par contre, quand les cellules issues des souris  $RAG2^{-/-}$  étaient injectés dans les souris 129/SvEv sauvages (Figure 12d), 8/20 tumeurs furent rejetées quelques jours après injection. Les tumeurs émergentes dans les souches immunodéficientes semblent donc plus immunogéniques que celles apparaissant dans une souris immunocompétente. Ces données impliquent directement l'immunité dans la formation de tumeurs moins immunogéniques.



**Figure 12 - Immunogénicité accrue des tumeurs issues de souris immunodéficientes.**

Les souris RAG2<sup>-/-</sup> reçoivent à J0  $1.10^5$  cellules tumorales dérivées de souches sauvages 129/SvEv (a) ou RAG2<sup>-/-</sup> (b). La progression tumorale est présentée comme la moyenne du diamètre tumorale par souris. Les souris 129/SvEv × RAG2<sup>-/-</sup> F1 reçoivent à J0  $1.10^6$  cellules tumorales dérivées de souches sauvages 129/SvEv (c) ou RAG2<sup>-/-</sup> (d). La progression tumorale est présentée comme la moyenne du diamètre tumorale par souris. Adapté de (Shankaran et al., 2001).

Une étude complémentaire réalisée en 2007 a permis d'étoffer les données sur l'état d'équilibre de l'immunoédition (Figure 13).



**Figure 13 - Le système immunitaire entretient un état d'équilibre**

A. Protocole d'évaluation de la notion d'état d'équilibre immunitaire au cours de la tumorigenèse. B. 16 souris sont traitées avec 25 mg de MCA. A J200, les souris n'ayant pas développées de tumeurs reçoivent quotidiennement une injection d'anticorps isotypique contrôle (B) ou d'anticorps anti CD4/anti-CD8/anti-IFN- $\gamma$  (C) et l'apparition de tumeur tardive fut contrôlée. Adapté de (Koebel et al., 2007).

Ici, l'équipe de Schreiber a suivi le protocole suivant. 200 jours après induction de sarcome par injection de MCA, les souris ne présentant pas de tumeur étaient traitées chaque semaine par un anticorps contrôle ou un cocktail d'anticorps dépletant anti-CD4/anti-CD8 et anti-IFN- $\gamma$ . Après quelques jours, la progression tumorale chez les souris traitées par les anticorps dépletant repris rapidement alors que cet effet n'est pas observé chez les souris traitées par l'anticorps isotypique contrôle (Koebel et al., 2007). Cette expérience nous informe d'une donnée très importante : le système immunitaire entretient un état d'équilibre dynamique prévenant l'évolution cancéreuse. Lorsque cet équilibre est brisé, le cancer peut de nouveau progresser (Koebel et al., 2007). Cet étape d'équilibre dont la durée est très variable nécessite une étude approfondie pour comprendre dans quelles proportions les mécanismes immunitaires (notamment l'inflammation (Swann et al., 2008) peuvent influencer l'émergence des clones moins immunogéniques.

Enfin, la troisième étape est la phase d'échappement aux propriétés immunitaires de l'organisme et à la poursuite de la progression tumorale. Par conséquent, notre système immunitaire favorise involontairement le développement des tumeurs résistantes à ces propres mécanismes de protection, on parle d'immunoédition de la tumeur par le système immunitaire. Le concept d'immunoédition est résumé dans la figure suivante (Figure 14).

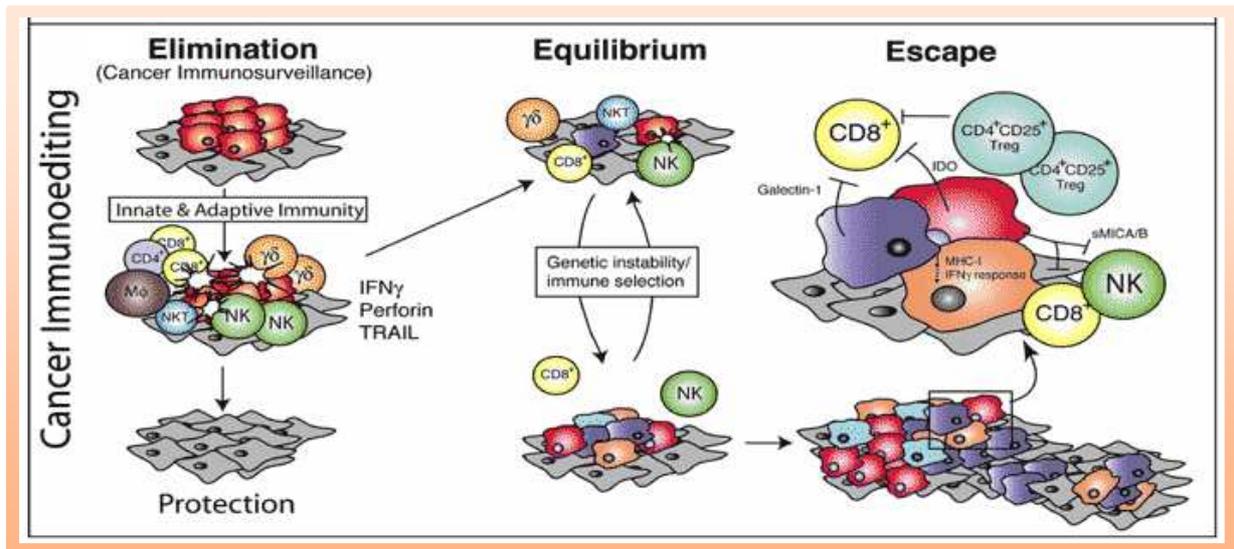


Figure 14– Concept d'immunoédition basé sur la théorie des 3E (Elimination, Equilibre et Echappement).

L'immunoédition peut être scindée en 3 processus. La phase d'élimination correspond à l'immunosurveillance et comprends l'ensemble des mécanismes immunitaires mis en œuvre pour enrayer la progression tumorale. La phase d'équilibre représente les mécanismes (instabilité génique, sélection immunitaire), en partie immunitaire, qui favorisent l'émergence de clones tumoraux capables de résister à la réponse immunitaire. Enfin, l'étape d'échappement correspond à l'expansion incontrôlée des cellules tumorales ayant échappées à la surveillance immunitaire. Adapté de (Dunn et al., 2002).

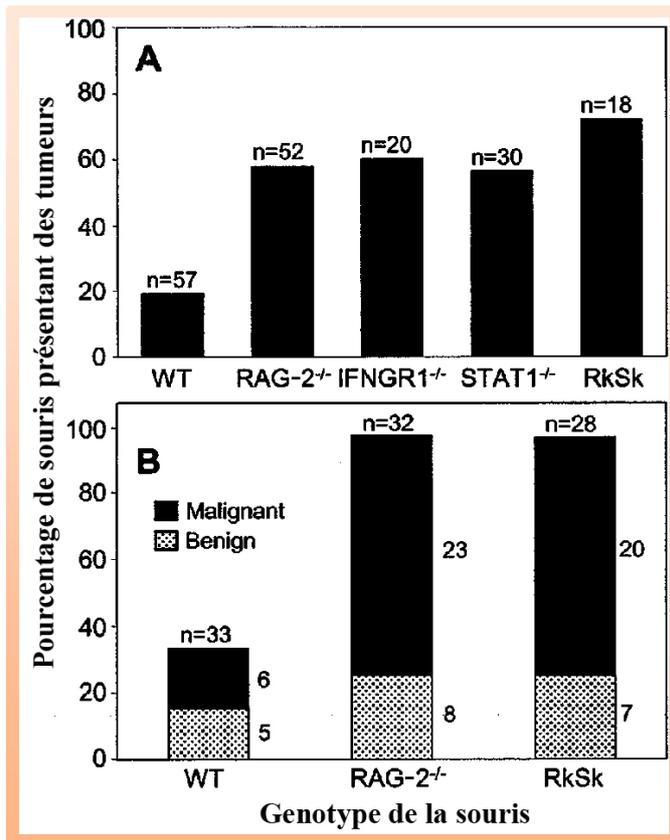
Notre travail ici s'attachera à décrire les mécanismes d'immunosurveillance connus chez l'homme et la souris.

### 2.2.1 CHEZ LA SOURIS

Les premières études murines concluantes sur l'immunosurveillance ont été réalisées dans les années 90 (Dighe et al., 1994). Dans des modèles de souris déficientes pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$  (IFNGR) ou insensibles à la signalisation des cytokines de la famille IFN (souris déficientes pour STAT1), l'équipe de Schreiber a pu démontrer que ces souris développaient des tumeurs plus rapidement et à une fréquence plus élevée que les souris témoins lorsqu'elles étaient traitées par le carcinogène chimique MCA (Kaplan et al., 1998). De plus, certaines souches de souris déficientes étaient plus susceptibles à des formes de cancers comme les lymphomes (C57BL/6 IFN- $\gamma^{-/-}$ ) ou les adénocarcinomes du poumon (BALB/cIFN- $\gamma^{-/-}$ ). Par la suite, d'autres modèles murins confirmèrent le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans la protection de l'organisme contre le développement de tumeurs spontanées ou induites par des composés chimiques (Dighe et al., 1994; Street et al., 2001; Street et al., 2002). Le second élément déterminant dans l'étude de l'immunosurveillance concerne les souris déficientes pour la perforine (pfp $^{-/-}$ ) dans des modèles de tumeurs induites par MCA (Smyth et al., 2000; Street et al., 2001; Street et al., 2002; van den Broek et al., 1996). La perforine est un élément clé de la cytotoxicité cellulaire induite par les lymphocytes T CD8+ cytotoxique et les lymphocytes NK. Les souris déficientes BALB/c pfp $^{-/-}$  présentent de plus forte incidence de lymphomes spontanées et d'adénocarcinomes du poumon. Collectivement, ces observations démontraient que la progression tumorale chez la souris était contrôlée par des éléments du système immunitaire.

L'étude qui permit de confirmer l'implication des lymphocytes et de l'immunité dans la destruction des cancers a été l'utilisation de souris déficientes pour le gène d'activation de la recombinaison (RAG-2). Les souris n'exprimant pas RAG-2 ne peuvent pas effectuer le réarrangement des récepteurs aux antigènes et sont par conséquent dépourvues de

lymphocytes T, B et NKT (Shinkai et al., 1992). Après une stimulation par le MCA, les souris 129/SvEv RAG-2<sup>-/-</sup> développaient des sarcomes plus rapidement et avec une fréquence plus élevée que les souris sauvages (Smyth et al., 2001b). Des résultats similaires ont été obtenus dans des expériences utilisant le MCA sur des souris C57BL/6 RAG-1<sup>-/-</sup> (Shankaran et al., 2001) conférant aux lymphocytes un rôle crucial dans la protection anti-tumorale. La synergie entre les voies d'actions suppressives des tumeurs (IFN- $\gamma$ , perforine, lymphocytes) a aussi été explorée par la production de souches murines déficientes pour différents éléments : IFNGR<sup>-/-</sup>, STAT1<sup>-/-</sup>, RAG-2<sup>-/-</sup> ou RAG-2<sup>-/-</sup>STAT1<sup>-/-</sup> (RkSk) (Shankaran et al., 2001). Dans les 4 conditions, les souris développèrent deux à trois fois plus de tumeurs lorsqu'elles étaient injectées avec la même dose de MCA. En outre, les souris immunodéficientes RkSk et RAG-2<sup>-/-</sup> élevées dans un environnement stérile présentent une incidence de cancer spontanée plus importante que les souris sauvages. De plus les souris RkSk présentaient une plus forte incidence que les groupes déficients pour un seul gène, supportant le rôle d'intervenants de l'immunité innée dans l'immunosurveillance (Figure 15).



**Figure 15 - Incidence accrue des tumeurs spontanées et induites par le MCA chez les souris immunodéficientes.**

A. Des souris d'âge et de sexe correspondant ont reçu 100 µg de MCA et furent observées pour le développement tumoral pendant 160 jours. B. des souris élevées dans un environnement stérile ont été contrôlées pour l'émergence de tumeurs spontanées pendant une période allant de 13 à 24 mois. Adapté de (Shankaran et al., 2001).

## 2.2.2 CHEZ L'HOMME

La démonstration d'une immunosurveillance établie chez la souris pose la question d'un processus similaire chez l'homme. Tout d'abord, les patients immunodéficients suite à une thérapie immunosuppressive ou une maladie génétique sont plus susceptibles aux tumeurs malignes induites suite aux infections virales (sarcome de Kaposi, lymphome non Hodgkynien) que les individus sains (Gatti and Good, 1971; Scadden, 2003). De plus, les patients transplantés traités par immunosuppresseurs présentent une incidence plus élevée de plusieurs types de cancer (colon, poumon, rein) d'origine non virale (Birkeland et al., 1995; Pecqueux et al., 1990; Penn, 1995). En complément des données précédentes, on peut citer les cas de transplantations involontaires de cellules cancéreuses conjointement à un organe chez des patients sous traitements immunosuppresseurs. Ces patients développent rapidement des cancers puisque leur système immunitaire diminué ne peut contenir la progression tumorale

(Koebel et al., 2007). Chez de nombreux patients atteints de cancer, il a été démontré la présence d'anticorps, de lymphocytes NK ou de CTL spécifiques infiltrant la tumeur (Coca et al., 1997; Mami-Chouaib et al., 2002; Scanlan et al., 2002; Zeuthen et al., 1998). Ces infiltrats sont des marqueurs de bon pronostic pour les patients atteints (Coca et al., 1997; Galon et al., 2006; Ishigami et al., 2000; Villegas et al., 2002). Plus récemment, une étude japonaise s'est intéressée à la corrélation entre l'efficacité cytotoxique des cellules immunitaires et l'incidence du cancer sur une cohorte de 3625 patients sur une durée de 11 ans. Les conclusions obtenues indiquent que les patients possédant une faible cytotoxicité cellulaire ont un risque accru de développement cancéreux (Imai et al., 2000). L'ensemble de ces données atteste d'une implication directe de l'immunité innée et de l'immunité adaptative dans les réponses immunitaires anti-tumorales.

---

### 2.3 ROLES DES NK DANS L'IMMUNOSURVEILLANCE

En addition de leur rôle antiviral et antibactérien, les lymphocytes NK sont maintenant considérés comme les cellules principales de l'immunité innée anti-tumorale. Les preuves expérimentales de leur rôle anti-tumoral ont été maintes fois établies. Les études réalisées par l'équipe de Schreiber citées précédemment et d'autres supportent un rôle des lymphocytes NK dans le contrôle des tumeurs nouvellement formées puisque elles affectent des molécules effectrices des cellules NK. Les modèles déficients pour  $RAG2^{-/-}STAT1^{-/-}$  présentent des risques accrus de développement spontané d'adénocarcinome mammaire, impliquant les lymphocytes NK dans l'immunosurveillance (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001). Par la suite, des études réalisées sur des souris C57BL/6 déplétées en lymphocytes NK par utilisation d'un anticorps monoclonal anti-NK1.1, ont confirmé le rôle des NK. Ces souris étaient deux à trois fois plus sensibles que les groupes sauvages à la formation de tumeurs induites par MCA (Smyth et al., 2001b). De nombreuses études basées sur des modèles

similaires de déplétion NK confortèrent ces données (Hayakawa and Smyth, 2006b; Kim et al., 2000; Wu and Lanier, 2003). Un modèle intéressant d'étude de la réponse innée et des lymphocytes NK dans l'immunosurveillance a été développé par l'équipe de Smyth en 2004 (Street et al., 2004). Ils ont dans un premier temps produit des cellules de lymphomes B déficients pour le CMH I dans des souches de souris  $\text{pfp}^{-/-}\beta 2\text{-m}^{-/-}$ . Alors que les lymphomes B CMH I déficients transférés dans des souris  $\text{RAG1}^{-/-}$  furent rejetés par toutes les souris greffées, l'utilisation d'un anticorps anti-NK1.1 neutralisant les lymphocytes NK permit l'apparition rapide de tumeurs (20 jours après inoculation) chez ces souris (Street et al., 2004). Ce résultat souligne directement l'implication active des lymphocytes NK dans l'immunosurveillance. En outre, l'administration de cytokines stimulant l'activation ou la cytotoxicité NK comme l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-21 ou encore l'IFN- $\alpha/\beta$  augmente l'élimination de tumeurs implantées en accord avec un rôle des lymphocytes NK dans les réponses anti-tumorales (Hayakawa and Smyth, 2006b; Wu and Lanier, 2003).

Chez l'homme, c'est l'étude des polymorphismes KIR et leurs conséquences sur les traitements des leucémies qui a confirmé le rôle des NK dans les réponses anti-tumorales. Les premières données convaincantes proviennent de l'équipe italienne de Velardi A. (Ruggeri et al., 2002). Dans le but de fournir une alternative aux traitements conventionnels des hémopathies malignes qui peuvent présenter des risques importants suite à la maladie du greffon contre l'hôte (GvH), l'équipe de Velardi a réalisé une greffe haplo-identique de CSH déplétées en lymphocytes T. Cette déplétion permet de prévenir la GvH délétère pouvant survenir après greffe mais réduit d'autant plus les effets bénéfiques des lymphocytes T actifs contre la leucémie (GvL). Afin de compenser cette perte de réactivité, la greffe a été réalisée dans un contexte haplo-identique allogénique où les incompatibilités entre KIR exprimés par le donneur et CMH I du receveur étaient privilégiées. La génération d'une réponse alloréactive NK au cours de la greffe a été associée à un effet GvL important (60% de survie

pour les patients atteints de leucémie myéloïde aigue (LMA) contre 5% sans alloréactivité), une absence de GvH notable et un rejet de greffe plus faible se traduisant par une survie globale améliorée pour les patients (Ruggeri et al., 2002). Par la suite, l'utilisation de l'alloréactivité NK a été étendue au traitement des leucémies lymphoïdes aigues (LLA) chez l'enfant avec succès (Pende et al., 2009; Velardi et al., 2009). De plus, le mésappariement KIR donneur/CMH I receveur dans les allogreffes haplo-identiques de CSH entre patients non apparentés et sans déplétion T est aussi bénéfique pour le patient avec une survie globale et sans récurrence améliorée (survie globale à 5,5 ans de 87% contre 45%,  $p=0.006$  et survie sans récurrence de 87% versus 39%,  $p<0,0007$ ) (Giebel et al., 2003).

Les fonctions anti-tumorales des cellules NK peuvent provenir d'une cytotoxicité directe (Street et al., 2004) ou de leur production importante d'IFN- $\gamma$  puisque ce sont les principales cellules de l'immunité innée à sécréter l'IFN- $\gamma$ . Les rôles de l'IFN- $\gamma$  dans l'immunosurveillance est double. Dans un premier temps, l'IFN- $\gamma$  peut cibler directement la tumeur. Ainsi, des tumeurs Meth A modifiées génétiquement pour exprimer un récepteur dominant négatif à l'INF- $\gamma$  ont une croissance plus rapide que les cellules Meth A contrôles (Dighe et al., 1993). De plus, les tumeurs insensibles ne déclenchent pas de réponse immunitaire à leur rencontre et ne sont pas reconnues par le système immunitaire de souris immunisées par la lignée tumorale Meth A. D'autres études ont confirmé ces résultats en réalisant des transferts adoptifs de tumeurs générées dans des souris IFNGR<sup>-/-</sup> dans des souris sauvages immunocompétentes (Kaplan et al., 1998). Dans les souris sauvages, les cellules tumorales IFNGR<sup>-/-</sup> étaient fortement tumorigéniques et formaient de nombreuses tumeurs avec de très faibles quantités injectées (10-100 cellules/souris). Lorsque ces cellules sont rendues sensibles à l'IFN- $\gamma$ , elles sont rapidement rejetées, fortement immunogéniques et ne parviennent pas à produire des tumeurs même à fortes doses ( $5.10^6$  cellules/souris). L'ensemble de ces données confirme le rôle direct de l'IFN- $\gamma$  sur le rejet tumoral. Les effets

de l'IFN- $\gamma$  sur la promotion du rejet tumoral sont nombreux. L'IFN- $\gamma$  est capable de stimuler l'expression des molécules du CMH I et d'augmenter la reconnaissance tumorale par les CTL (Shankaran et al., 2001). L'IFN- $\gamma$  peut avoir des propriétés antiprolifératives (induction de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ou p27<sup>KIP1</sup>) (Bromberg et al., 1996; Chin et al., 1996) et pro-apoptotiques (induction de la caspase-1, Fas, Fas-L, TRAIL) (Chin et al., 1997; Detjen et al., 2001; Takeda et al., 2001; Xu et al., 1998). Enfin, l'IFN- $\gamma$  peut stimuler l'expression de chimiokines attractives pour les populations lymphocytaires par les cellules tumorales (CXCL-9, IP-10) (Keane et al., 1997).

Dans un second temps, l'IFN- $\gamma$  peut jouer un rôle de stimulation du système immunitaire. Les souris possédant un système immunitaires déficients pour STAT1 sont incapables de rejeter la tumeur hautement immunogénique P198 alors qu'elle est totalement éliminée par les souris sauvages (Fallarino and Gajewski, 1999). De plus, dans un modèle murin favorisant la polarisation Th1 des lymphocytes T (un rôle dépendant de l'IFN- $\gamma$ ), il a été démontré que la lignée tumorale peu immunogénique P1.HTR était spontanément rejetée alors que ce n'était pas le cas dans les groupes contrôles (Kacha et al., 2000). Des études plus récentes ont perfectionné ce modèle d'études et démontrés que la production d'IFN- $\gamma$  des lymphocytes NK favorisait la maturation des DC immatures vers une phénotype permettant l'établissement d'une réponse Th1 CTL efficace (Adam et al., 2005; Liu et al., 2008; Mocikat et al., 2003). Collectivement, ces études suggèrent que l'IFN- $\gamma$  produit par les cellules NK est fortement impliqué dans le rejet tumoral que ce soit par ces effets directs sur les cellules tumorales ou sur les cellules du système immunitaire.

Le deuxième aspect de l'immunosurveillance appliquée par les lymphocytes NK provient de leurs propriétés cytotoxiques directes. On distingue des études réalisées sur les 2 voies cytotoxiques principales des lymphocytes NK : la voie dépendante des récepteurs de mort

(TRAIL et Fas/FasL) et la voie dépendante de la sécrétion de granules granzyme B/perforine (NKG2D principalement).

Premièrement, les études s'intéressant au membre de la superfamille du TNF, TRAIL, constitutivement exprimé par les lymphocytes NK du foie, ont montrés que des souris déficientes pour TRAIL ou traitées par un anticorps neutralisant TRAIL ont une plus grande incidence de fibrosarcomes induits par MCA (Cretney et al., 2002; Takeda et al., 2002). De plus, l'administration d'un anticorps bloquant TRAIL chez des souris greffées favorise le développement de tumeurs sensibles à TRAIL (L929, LB27.4, Renca) alors que la courbe de croissance des lignées résistantes (P815, B16) n'est pas modifiée (Nishihori et al., 2009; Takeda et al., 2001). Cet effet est purement dépendant des lymphocytes NK puisque leur déplétion dans ces modèles abroge l'effet bénéfique de TRAIL (Takeda et al., 2001). Des études complémentaires ont montré que les lymphocytes NK pouvaient prévenir le développement de métastases lors de xénogreffe de carcinome hépatique (Renca) par un mécanisme dépendant de TRAIL (Nishihori et al., 2009; Smyth et al., 2001a). Ce résultat confère à TRAIL un rôle plus tardif dans l'immunosurveillance NK alors que ces étapes sont plus généralement associées à l'immunité adaptative (Koebel et al., 2007). En ce qui concerne le récepteur de mort Fas et son ligand FasL, les données sont moins nombreuses mais il semble que cette signalisation ait été impliquée dans la lyse de tumeurs d'origines variées *in vitro* (Screpanti et al., 2005). L'utilisation d'anticorps neutralisants Fas sur les cellules tumorales dans des modèles de co-culture *in vitro* montre une diminution de la cytotoxicité NK contre les lignées OVCAR-3 et BT-20 (Kashii et al., 1999). Ces cellules sont insensibles à la cytotoxicité dépendante de la voie sécrétoire (perforine/granzyme) (Vujanovic et al., 1996) et ceci suggère l'existence d'une complémentarité des voies de reconnaissance tumorale des cellules NK. Des modèles *in vivo* ont poursuivi la caractérisation de la voie de signalisation et ont permis de démontrer la nécessité d'une activation préalable des lymphocytes NK (par

IL-2 ou poly I:C) pour l'utilisation de Fas/FasL (Bradley et al., 1998). Collectivement, ces données suggèrent que les voies d'induction d'apoptose par récepteur de mort (TRAIL and Fas/FasL) pourraient être responsables d'un contrôle secondaire du développement tumoral par les lymphocytes NK alors que la cytotoxicité dépendante de la perforine serait immédiate et primordiale dans le contrôle anti-tumoral.

La voie cytotoxique la plus étudiée dans la réactivité NK antitumorale est la voie NKG2D-NKG2DL. En effet, l'expression des NKG2DL n'est pas retrouvée sur les tissus sains. Par opposition, des conditions de stress cellulaire comme le choc thermique, les infections virales, les irradiations UV, l'instabilité génomique ou encore les dommages à l'ADN stimulent l'expression des NKG2DL (Groh et al., 1996; Groh et al., 2001). Plus particulièrement, les NKG2DL sont surexprimés suite à des stress génotoxiques dans la réponse associée aux dommages à l'ADN (Gasser et al., 2005). La voie de réparation des dommages à l'ADN implique l'activation des kinases ATM (Ataxia telangiectasia, mutated) et ATR (ATM and Rad3-related) qui perçoivent les ruptures des brins d'ADN ou les réplifications erronées de l'ADN. La répression d'ATM prévient l'expression des NKG2DL par les cellules tumorales, ce qui suggère que l'expression des NKG2DL par les cellules malignes pourrait provenir d'une activation chronique des voies de dommages à l'ADN (DiTullio et al., 2002). En effet, de nombreuses études montrent l'expression préférentielle de MICA ou MICB dans une grande variété de pathologies cancéreuses (tumeurs épithéliales, mélanomes, carcinomes hépatiques et leucémies) (Chen et al., 2008b; Groh et al., 1996; Groh et al., 1999; Jinushi et al., 2003; Textor et al., 2008; Vetter et al., 2002). De manière analogue aux travaux de Raulet D.H, il a été montré que l'acquisition d'oncogène tel que bcr-abl, un événement stressant pour la cellule, pouvait promouvoir l'expression membranaire de MICA sur des cellules leucémiques (Terme et al., 2005). Par conséquent, il a été émis l'hypothèse que l'expression

accrue des NKG2DL lors des stress cellulaires pouvait représenter un mécanisme de contrôle précoce de la transformation tumorale par les lymphocytes NK (Smyth et al., 2005).

L'efficacité de l'élimination tumorale par la voie NKG2D a été démontrée dans de nombreux modèles. Lorsque on induit une expression ectopique des NKG2DL murin Rae1 $\beta$  et H60 dans des cellules résistantes à la lyse NK, une prévention de l'implantation tumorale est observée (Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001). Cet effet est directement corrélé à l'expression de NKG2D par les lymphocytes NK (Oppenheim et al., 2005; Wiemann et al., 2005). De manière similaire, l'utilisation d'anticorps neutralisant NKG2D dans des modèles de sarcomes induits par le MCA chez la souris augmente fortement l'incidence de tumeur spontanée (Smyth et al., 2005; Smyth et al., 2004). Récemment, l'équipe de Raulet D.H. a permis de comprendre l'implication de NKG2D dans le contrôle des carcinomes agressifs de haut grade grâce à différents modèles murins NKG2D<sup>-/-</sup> (Guerra et al., 2008). Le premier modèle d'étude était basé sur des souris TRAMP (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate) déficientes pour NKG2D. Les souris TRAMP ont des cellules épithéliales de la prostate qui expriment les gènes précoces du virus simiesque SV40 (small t and large T antigen) sous la dépendance du promoteur de la probastine du rat. Cette construction favorise le développement spontané de cancer prostatique à un âge précoce chez les souris transgéniques. Dans ce contexte, l'émergence précoce de tumeurs prostatiques était trois fois plus fréquente chez les souris double négative par rapport au souris TRAMP (Guerra et al., 2008). De manière similaire, le modèle murin E $\mu$ -*Myc* a permis d'impliquer NKG2D dans la genèse des lymphomes B. Ces souris expriment l'oncogène *Myc* sous la dépendance de l'enhancer de la chaîne lourde de l'E $\mu$ - $\beta$ m, du promoteur de *Myc* et succombent de lymphomes B agressifs. Lorsque NKG2D est réprimé chez ces souris, le développement de lymphomes B est plus rapide (7 semaines plus tôt) que les souris contrôles (Guerra et al., 2008).

Dans les deux études citées, les tumeurs retrouvées dans un environnement dépourvu de NKG2D présentaient une expression accrue des NKG2DL par rapport aux tumeurs se développant dans une souche sauvage, suggérant qu'un contrôle immunitaire instauré par les lymphocytes NK exprimant NKG2D pourrait enrayer la progression de ces tumeurs chez une souris sauvage (Guerra et al., 2008). On peut remarquer que les souris transgéniques exprimant de manière constitutive et ubiquitaire les NKG2DL MICA ou Rae1 $\epsilon$  présentent une diminution d'expression de NKG2D sur les lymphocytes NK et une diminution de leurs fonctions anti-tumorales (Oppenheim et al., 2005; Wiemann et al., 2005). Cette observation confirme que l'expression de NKG2DL est perçue dans des conditions physiologiques comme un phénomène anormal et supporte l'implication de NKG2D dans les mécanismes d'immunosurveillance. Enfin, la signalisation NKG2D implique principalement une cytotoxicité dépendante de la perforine puisque dans les études citées, l'utilisation d'anticorps neutralisant NKG2D n'augmente pas l'incidence de cancer en comparaison de souris contrôles déficientes pour la perforine (Smyth et al., 2005; Smyth et al., 2004).

Chez l'homme, l'étude des polymorphismes de NKG2D a montré l'existence de groupes d'allèles définissant deux haplotypes ayant des efficacités cytotoxiques différentes. L'haplotype associé à une forte activité cytotoxique (allèles HNK1, LNK2, HNK2) est corrélé à un risque de cancer plus faible que les groupes d'allèles caractérisant une faible activité cytotoxique (allèle LNK1) (Hayashi et al., 2006). Ces résultats désignent NKG2D comme une molécule critique dans les réponses anti-tumorales. Certaines études sur la corrélation entre l'expression de NKG2DL et le pronostic de cancer ont été réalisées pour qualifier le rôle de cette voie dans l'immunosurveillance. Si les données obtenues impliquent clairement les NK et les NKG2DL dans les mécanismes de contrôles tumoraux, on dénote des résultats divergents. Ainsi, une étude de Watson N.F. de 2006 démontre que l'expression de MICA chez les patients atteints de cancer colorectal est de bon pronostique (Watson et al., 2006b).

En outre, cette observation est vraie quelque soit le stade TNM (0/I/II/III/IV) du patient. Des résultats similaires ont été obtenus dans les cancers du col de l'utérus et les mélanomes (Jordanova et al., 2008; Vetter et al., 2002). Cependant, une forte expression de MICA a aussi été corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers du sein invasif de haut grade (Madjd et al., 2007) et l'expression d'ULBP2 et RAET1E dans les cancers de l'ovaire est corrélée à une infiltration lymphocytaire intra-tumorale réduite et à un mauvais pronostic pour le patient (Li et al., 2009). Les gènes MIC étant polymorphiques, il serait intéressant de corréler les modifications fonctionnelles liées à ces polymorphismes aux réponses cliniques des patients. Collectivement, ces études montrent un rôle critique de NKG2D dans les voies de surveillance de tumorigenèse par les NK (McGivary et al.).

Bien que les cellules NK possèdent de nombreux mécanismes leur permettant de contrôler les cellules en cours de transformation, l'observation d'un développement cancéreux chez les individus immunocompétents suggèrent que les cellules tumorales parviennent néanmoins à outrepasser les défenses immunitaires. Ainsi, on peut dénombrer de nombreuses stratégies employées par les cellules tumorales pour parvenir à détourner l'immunité innée. Par exemple, certaines lignées leucémiques (i.e. CEM) peuvent sur-exprimer le CMH I pour induire un signal inhibiteur plus intense chez les lymphocytes NK (Classen et al., 2003). Une étude de Miller et coll. démontrent que les patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques présentent des populations NK anormales dans leur nombre, leur phénotype et leurs fonctions. D'autres travaux montrent que l'expression des NCR peut être diminuée chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë. Cette répression se traduit par une activité cytotoxique fortement réduite des lymphocytes NK du patient (Costello et al., 2002). Enfin, de nombreuses tumeurs surexpriment la molécule du CMH I HLA-G ce qui a pour conséquence directe de réprimer les réponses NK par l'engagement des récepteurs inhibiteurs ILT-2 et KIR2DL4 (Rouas-Freiss et al., 2005; Urosevic and Dummer, 2008). En outre, il faut

noter l'existence d'une forme soluble du HLA-G (sHLA-G) qui peut directement influencer l'activation des cellules NK. L'équipe de Selmani Z. et al. a par exemple démontré une implication directe de la sécrétion de HLA-G5 dans le contrôle de la réponse NK via la répression de leurs fonctions cytotoxiques directes ainsi que leur production d'IFN- $\gamma$  (Selmani, Z. et al, 2008). Par la suite, les travaux réalisés par Gros et al. ont confirmés le rôle important de la forme soluble de HLA-G dans les interaction NKDC (Gros F. et al. 2008). Plus précisément, le prétraitement de DC avec la forme sHLA-G diminue fortement l'activation précoce des cellules NK tant en sécrétion de cytokines inflammatoires qu'en activité cytotoxique.

Il existe des mécanismes d'inhibition spécifiquement associés au NKG2DL et qui influencent donc directement l'efficacité des réponses NK. De nombreux sérums de patients atteints de pathologies malignes épithéliales et hématopoïétiques contiennent des formes solubles de NKG2DL (sNKG2DL) (principalement MICA et MICB) (Groh et al., 2002; Salih et al., 2002). Des études complémentaires ont montré que ces formes solubles étaient issues de la digestion enzymatique des formes membranaires de MICA et MICB par des métalloprotéinases matricielle (MMP) (Salih et al., 2002). L'expression accrue de ces endopeptidases est souvent corrélée à l'évolution des cellules tumorales vers un stade avancé (Rydlova et al., 2008). La surexpression de ces MMP pourrait expliquer le passage des cellules tumorales à un stade avancé insensible aux réponses anti-tumorales NK. En effet, ces ligands solubles ont une fonction de leurre qui détourne les lymphocytes NK des cibles tumorales. De plus, il a été montré que l'interaction de MICA soluble (sMICA) avec NKG2D entraîne son internalisation et la diminution de sa présentation membranaire. En complément d'information, on peut remarquer qu'une expression réduite de NKG2D par les lymphocytes T et NK infiltrant les tumeurs de patients est souvent corrélée à un taux sérique élevé de sMICA (Wu et al., 2004). Alternativement, la production de sMICA peut stimuler la

prolifération d'une population immunosuppressive lymphocytaire NKG2D<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Cette population est capable de détruire les cibles exprimant le récepteur Fas puisqu'elle exprime de grande quantité de FasL (Groh et al., 2006). Il existe également des formes solubles d'ULBP2 (sULBP2) détectées chez des patients atteints de pathologies hématologiques malignes et issues du même type de clivage produits chez MICA et MICB par les MMP (Waldhauer and Steinle, 2006). Un autre médiateur important de l'immunosuppression des lymphocytes NK est le TGF- $\beta$  (isoforme 1 et 2). L'exposition chronique des lymphocytes NK à cette cytokine peut entraîner une réduction de l'expression de NKG2D (Castriconi et al., 2003; Crane et al.; Friese et al., 2004). Le TGF- $\beta$  affecte de plus l'expression de NKp30 mais aussi de certains NKG2DL sur les cellules tumorales (MICA, ULBP2 et ULBP4) en réduisant le taux d'ARNm (Eisele et al., 2006). Enfin, il faut noter que l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) peut aussi réprimer les fonctions NK. Cette enzyme, qui peut produire le catabolite L-kynurenine à partir du tryptophane, est connue pour ces fonctions antiprolifératives chez les lymphocytes T. Des données plus récentes démontrent qu'IDO peut aussi réprimer les lymphocytes NK puisque le L-kynurenine est un inhibiteur de l'expression de NKp46 et NKG2D, ce qui peut nuire directement aux fonctions anti-tumorales NK. Collectivement, les sNKG2DL, IDO et le TGF- $\beta$  présentent autant de mécanismes d'immunosuppression NK qu'il est important de détailler pour produire des stratégies thérapeutiques efficaces.

Si les premières suggestions du concept d'immunosurveillance ne furent pas convaincantes, les études récentes sur des modèles murins déficients ont permis de démontrer l'implication directe de l'immunité dans le contrôle de l'évolution tumorale. Alors que la phase d'élimination est très largement décrite dans la littérature, la phase d'équilibre, responsable de l'évasion tumorale, reste peu détaillée. Afin de mieux comprendre cette étape clé, notre travail de thèse s'attachera à évaluer plus particulièrement les mécanismes potentiels mis en place au cours de la phase d'équilibre pour favoriser l'évasion tumorale.

# Objectifs de notre travail de thèse

Notre thèse de sciences a pour objectif de déterminer les facteurs oncogéniques activés par les cellules tumorales pour prévenir les fonctions anti-tumorales des lymphocytes NK.

Un nombre conséquent de données supportent la théorie d'immunosurveillance. Que ce soit la branche innée ou adaptative, nos mécanismes de défenses immunitaires sont importants pour le contrôle des développements tumoraux *in vivo* (Smyth et al., 2006). Ainsi, dans les contextes où l'immunité est déficiente e.g. patients sous immunosuppresseurs, il est observé une incidence de cancer plus élevée que chez les patients sains (Birkeland et al., 1995; Pecqueux et al., 1990). En dépit de ces observations, on ne peut que constater le développement de tumeur chez les patients immunocompétents. Cette réalité peut être expliquée de manière rationnelle par le concept des 3E, à savoir : Elimination, Equilibre et Evasion (Dunn et al., 2002). Si la première étape a été largement documentée, la compréhension de la phase d'équilibre, transition critique permettant à terme l'échappement du cancer à l'immunité anti-tumorale, n'a pas été autant étudiée. Notre émettons ici l'hypothèse de travail selon laquelle certaines protéines oncogéniques seraient capable de promouvoir des voies d'évasion immunitaire menant par la suite à la progression tumorale.

L'étude des pathologies inflammatoires chroniques a révélé un candidat potentiel pour notre étude, le facteur de transcription Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3). STAT3 est une protéine pro-oncogénique impliquée dans la signalisation de protéines inflammatoires telles que l'IL-6. Il a été démontré que STAT3 était directement corrélé au développement des cancers associés à l'inflammation chronique. Ce contexte particulier suggère que STAT3 pourrait influencer le développement tumoral dans un environnement enrichi en cellules immunitaires activées. STAT3 semble de plus influencer la polarisation

immunitaire et stimule la transcription des gènes du TGF- $\beta$  et de l'IL-10. La dualité de STAT3 en fait donc une protéine potentiellement intéressante pour notre étude. Nous nous sommes focalisés sur l'implication de STAT3 dans l'immuno-modulation de l'immunité innée.

Dans un premier temps, nous allons évaluer l'influence de STAT3 sur les fonctions anti-tumorales des lymphocytes NK. Nous allons analyser la production d'IFN- $\gamma$  et la cytotoxicité des cellules NK mises en présence de lignées tumorales surexprimant ou réprimant la protéine STAT3. Nous allons ensuite tenter de comprendre le lien entre STAT3 et les mécanismes d'immunoévasion aux lymphocytes NK déjà décrits dans la littérature (TGF- $\beta$ ).

Nous allons évaluer le rôle de STAT3 dans l'expression des NKG2DL à la surface des lignées tumorales étudiées. Enfin, des études en immunoprécipitation de chromatine et des protocoles d'analyse de promoteur par luciférase nous indiqueront le lien entre STAT3 et régulation des gènes des NKG2DL.

# ***Résultats***



## 1.1 GENERALITES

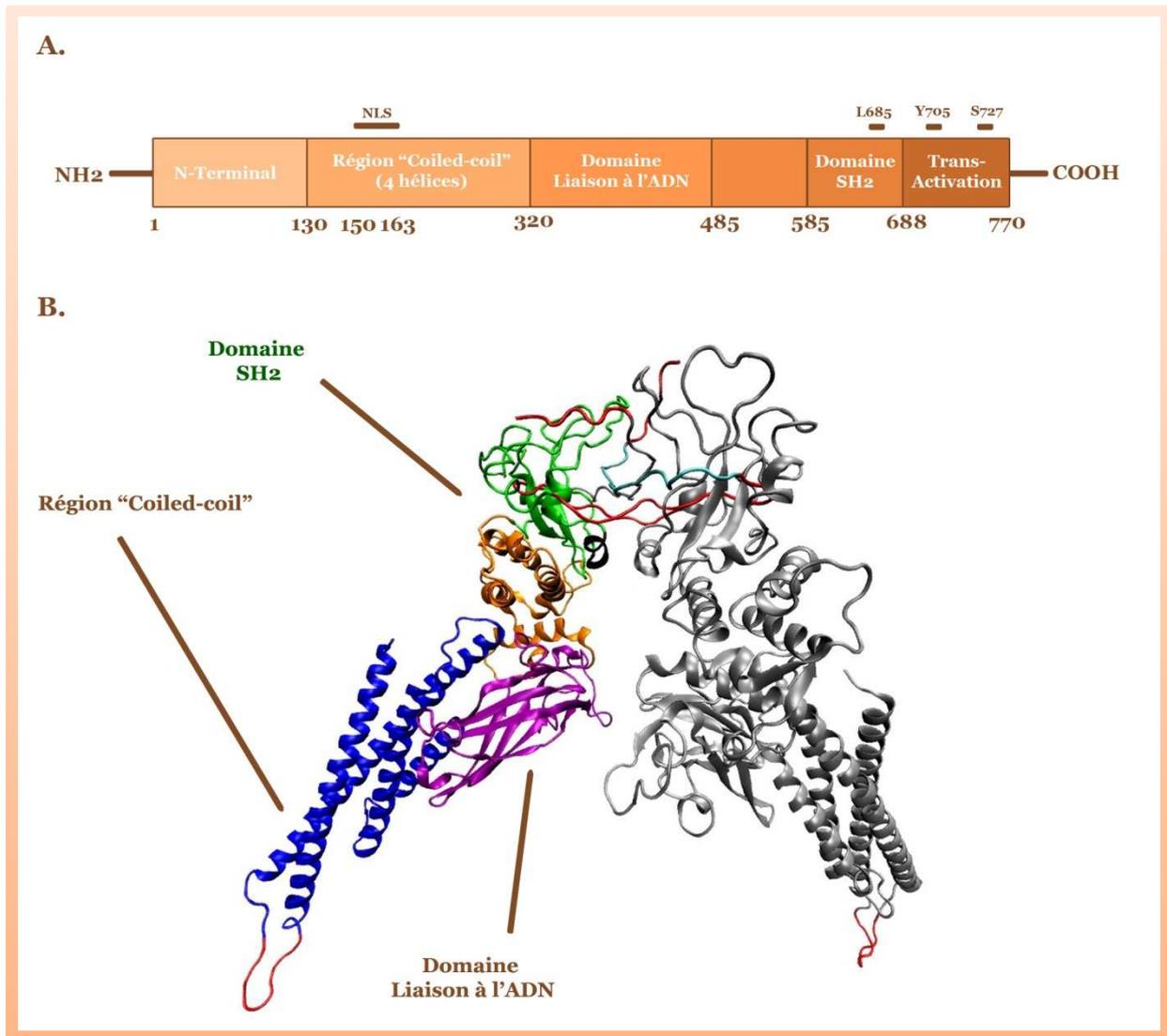
STAT3 a été identifié comme étant un facteur protéique s'associant aux éléments de réponse à l'IL-6 dans les promoteurs des gènes de réponse de phase aigüe de l'inflammation (APRF) suite à la stimulation d'hépatocytes par l'IL-6 (Akira et al., 1994). De plus, Il fut indépendamment identifié comme étant une protéine se fixant à l'ADN en réponse à la stimulation par EGF (Zhong et al., 1994). On sait désormais que STAT3 est impliqué dans de nombreuses signalisations cytokiniques (IL-6, IL-10, RANTES, EGF, PDGF...). STAT3 appartient à la famille des facteurs de transcription STAT. Cette famille de protéines se compose de 7 membres (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT6 et les protéines apparentées STAT5A et STAT5B). Les protéines de cette famille possèdent deux caractéristiques principales : elles peuvent transmettre un signal au niveau du cytoplasme puis agir comme facteur de transcription dans le noyau. Les interactions protéines-protéines induites par ces molécules reposent sur des résidus tyrosine dont la phosphorylation conditionne leur dimerisation. Elles peuvent former des homodimères (STAT3/STAT3) ou des hétérodimères (STAT1/STAT3). Après formation, les complexes sont rapidement acheminés dans le noyau par des protéines de type « importine » pour se lier à leurs séquences spécifiques et réguler les gènes cibles. Il existe à ce jour deux séquences consensus pour la fixation de STAT3 décrites dans la littérature. La séquence consensus la plus communément citée est « **TTCCNGGAANN** » ou N est un nucléotide quelconque (Horvath et al., 1995). Les nucléotides en gras représentent la séquence minimum nécessaire pour la fixation STAT3 à l'ADN. La seconde séquence consensus, décrite plus récemment est la suivante : « **NNTTCCNGGNNNN** » ou N = G ou A (Chen et al., 2008a).

## 1.2 BIOLOGIE MOLECULAIRE DE STAT3

STAT3 est une protéine de 92 kDa, longue de 770 aa et encodée par un gène localisé sur le chromosome 17q21. Cette protéine possède deux isoformes issues d'un épissage alternatif et présentant des fonctionnalités différentes. La première isoforme, la plus longue, est nommée STAT3 $\alpha$  et possède l'intégralité des domaines protéiques nécessaires aux fonctions de STAT3 (Figure 16). On dénombre des domaines de type « coiled-coil » pour les interactions protéines - protéines, une séquence de localisation nucléaire (NLS) pour la translocation dans le noyau, un domaine de liaison à l'ADN, domaine SH2 et un domaine de trans-activation en position C-terminal. La seconde isoforme, nommée STAT3 $\beta$ , est tronquée dans la partie C-ter et ne dispose pas du domaine de trans-activation important pour les fonctions effectrices de STAT3. A ce titre, STAT3 $\beta$  a été considéré pendant longtemps comme étant un dominant négatif pouvant agir comme modulateur de la fonction de STAT3 $\alpha$  en formant des hétérodimères inactifs. Pourtant des données récentes attribuent à STAT3 $\beta$  un rôle de substitut à STAT3 $\alpha$  qui pourrait parfois prendre en charge certaines de ces fonctions (Maritano et al., 2004). STAT3 possède deux sites de phosphorylation différents en position Tyrosine 705 (Y705) et Sérine 727 (S727) et un site d'acétylation en position Lysine 685 (L685) qui vont conditionner l'activité de STAT3.

STAT3 est activé par de nombreuses cytokines (IL-6, Oncostatin M (OSM), IL-10, TNF- $\alpha$ ) (Akira et al., 1994), facteurs de croissances (EGF, PDGF) (Vignais et al., 1996) et hormones. STAT3 est nécessaire au développement embryonnaire puisque les souris déficientes pour STAT3 ne survivent pas au-delà du jour 7 de l'embryogénèse (Takeda et al., 1997). En raison du grand nombre de protéines nécessitant STAT3 pour leur signalisation, ce dernier joue un rôle crucial dans de nombreux mécanismes biologiques incluant l'hématopoïèse (Pfitzner et al., 2004), la survie cellulaire, la prolifération, l'angiogénèse mais

aussi plus particulièrement dans l'inflammation, la transformation cellulaire et l'invasion tumorale. Par conséquent, STAT3 est considéré comme étant un oncogène (Bromberg et al., 1999).



**Figure 16 - Représentation de la protéine STAT3.**

A. STAT3 possède un domaine « Coiled-coil » qui contient la séquence spécifique de localisation dans le noyau NLS. Le domaine SH2 est important pour la dimerisation de STAT3 et le domaine de trans-activation contient les deux sites de phosphorylation influençant les fonctions de STAT3. B. Structure cristallographique en trois dimensions représentant un dimère STAT3. Le domaine « Coiled-coil » est représenté en bleu, le domaine de liaison à l'ADN en violet, le domaine SH2 en vert. Adapté de(Lin et al., 2009).

---

## 1.3 MECANISMES DE SIGNALISATION DE STAT3

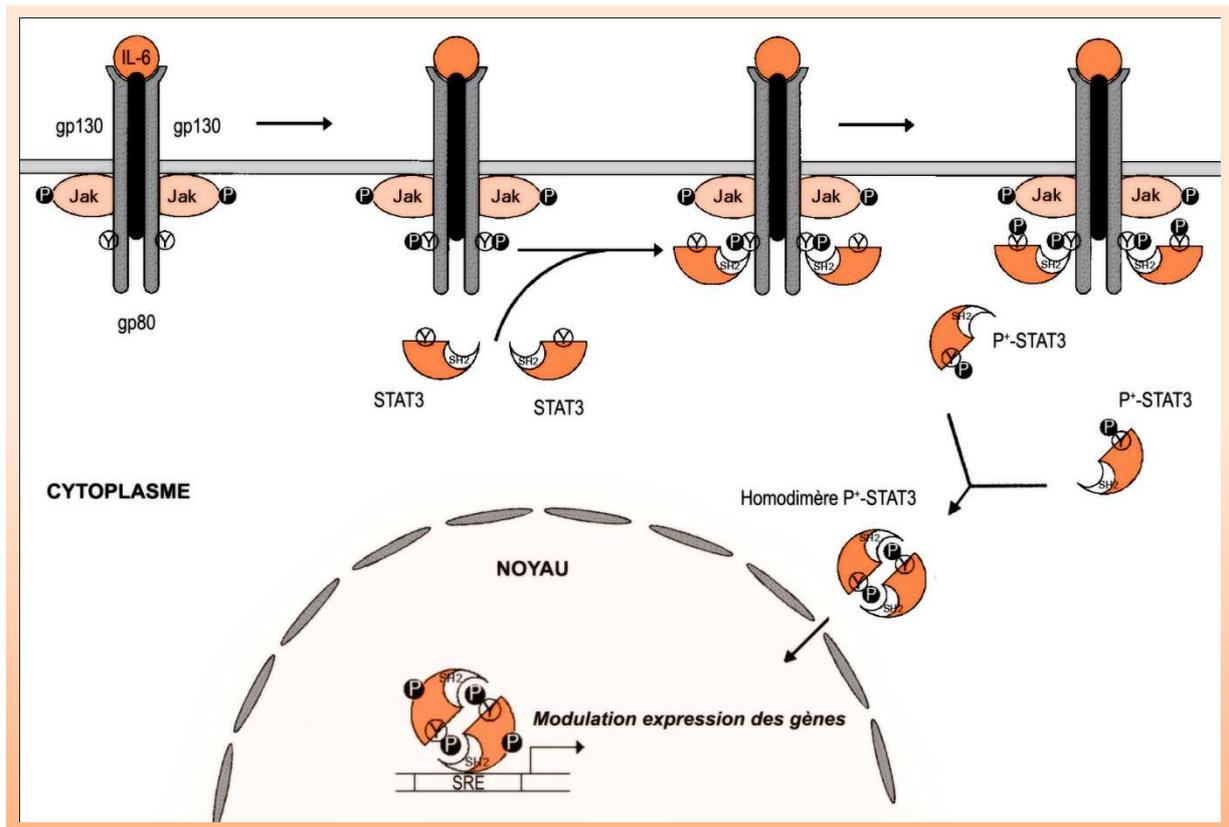
---

### 1.3.1 ACTIVATION DE STAT3

La signalisation des protéines STAT a été décrite dans un premier temps suite à des traitements par des cytokines en condition physiologique. STAT1 est par exemple nécessaire pour la signalisation de l'IFN- $\alpha$  alors que STAT3 est plutôt induit par les traitements à l'IL-6. Puisque la plupart des récepteurs de cytokines ou d'hormones ne possèdent pas de domaines à activité tyrosine kinase dans leur portion intracellulaire, ils s'associent à des tyrosines kinases pour transmettre leur signal après engagement de leurs ligands. Dans le cas des voies de signalisation impliquant STAT3, la famille préférentiellement utilisée est la famille des kinases JAK (Janus Kinase). La famille JAK est composée de 4 membres chez les mammifères : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. Ces protéines agissent de concert pour exercer leur activité. On peut citer la transduction du signal de l'IL-6 comme exemple (Figure 17).

Le récepteur à l'IL-6 (IL-6R) est composé de deux chaînes. La chaîne  $\alpha$  spécifique de l'IL-6 (CD126 ou gp80) et la chaîne  $\beta$  dite chaîne commune nommée gp130 (Murakami et al., 1993). La fixation de l'IL-6 dans la partie extracellulaire de la chaîne  $\alpha$  entraîne la dimerisation de deux chaînes gp130 via des ponts disulfures, la formation d'un complexe avec la chaîne  $\alpha$  et l'activation des kinases JAK (JAK1, JAK2, Tyk2) associées. Les JAK kinases se phosphorylent mutuellement puis stimulent la phosphorylation des résidus tyrosines présents dans la fraction intracellulaire des sous-unités gp130 (6 par sous-unités). La formation de résidus tyrosine phosphorylés fournit une zone d'ancrage aux protéines possédant un domaine SH2, notamment STAT3 et STAT1. Le déplacement des monomères STAT3 inactifs à la membrane et à proximité des JAK kinases entraîne leur phosphorylation au niveau de la tyrosine Y705. Pour finir, les protéines STAT3 phosphorylées forment des homodimères. Cette dimerisation libère les domaines NLS et le dimère STAT3 peut être

transporté dans le noyau pour stimuler les gènes cibles associés (Heinrich et al., 2003). Si des données montrent l'existence de dimères de STAT3 sans phosphorylation préalable, le rôle d'un tel état de transition n'a pas été clairement évalué (Braunstein et al., 2003). La forme dimérisée est probablement instable et facilite l'activation par phosphorylation en préparant la structure protéique comme c'est le cas pour PAK1 ou le CD45 (Parrini et al., 2002).



**Figure 17- Signalisation caractéristique de STAT3.**

Après fixation du ligand (ici IL-6) à son récepteur, les kinases JAK présentes au niveau intracellulaire vont se phosphoryler mutuellement. Par la suite, elles vont phosphoryler les résidus tyrosine présents sur les chaînes gp130, ce qui va permettre le recrutement des monomères de STAT3 via leur domaine SH2. Le recrutement des monomères STAT3 catalyse leur phosphorylation sur les résidus tyrosine Y705 qui favorise l'homodimerisation de STAT3. Après dimerisation, la séquence NLS se libère et permet le transport du dimère actif dans le noyau. STAT3 peut alors exercer ces fonctions de modulation d'expression génique. D'après (Heinrich et al., 1998).

Par la suite, d'autres kinases associées ou non à des récepteurs ont été impliquées dans la phosphorylation de STAT3 et la stimulation de son activité comme l'EGFR kinase (Garcia et al., 1997), ERK (Megheny et al., 1996) ou encore Src (Yu et al., 1995). Outre la phosphorylation en Y705, il a été reporté l'implication de certaines sérines kinases dans la régulation de l'activité STAT3 par phosphorylation en position S727. On peut citer la PKC (Aziz et al., 2007; Jain et al., 1999), MAPK et CDK5 (Fu et al., 2004). Cet état de phosphorylation est requis pour l'activation de STAT3 par divers stimuli (irradiations UV, dommages à l'ADN) (Zhang et al., 2003) et semble maximiser son activité de régulation transcriptionnelle (Yokogami et al., 2000). Enfin, l'acétylation de STAT3 en L685 réalisée par l'histone acetyltransferase p300 permet la stabilisation du dimère STAT3, un paramètre nécessaire pour l'association de STAT3 à l'ADN génomique (Yuan et al., 2005).

---

### 1.3.2 REGULATION DE L'ACTIVATION DE STAT3

L'activation de STAT3 est régulée négativement par des nombreuses voies de signalisation. On compte les protéines SOCS (Yoshimura et al., 2007) (suppressors of cytokine signaling), PIAS (protein inhibitor of activated STAT) et les tyrosines phosphatases (Figure 18).

#### 1.3.2.1 LES TYROSINES PHOSPHATASES

---

Les tyrosines phosphatases peuvent influencer différentes étapes du signal conduisant à l'activité STAT3. Elles agissent directement sur l'état de phosphorylation de STAT3 mais aussi indirectement en ciblant les tyrosines phosphorylées présentes dans les domaines intracellulaires des récepteurs de cytokines (gp130). On peut citer les phosphatases SHP-1 ou SHP-2 (Migone et al., 1998; Schaper et al., 1998) décrites précédemment qui peuvent s'associer au domaine SH2 et déphosphoryler les protéines avec lesquelles elles interagissent. La phosphatase CD45 peut interférer avec les protéines de la famille JAK (Irie-Sasaki et al.,

2001) en les dephosphorylant ce qui prévient le recrutement de STAT3. Enfin, PTEN peut bloquer les fonctions de STAT3 en réprimant la voie de signalisation PI3K/Akt (Sun and Steinberg, 2002).

### 1.3.2.2 LES PROTEINES SOCS

---

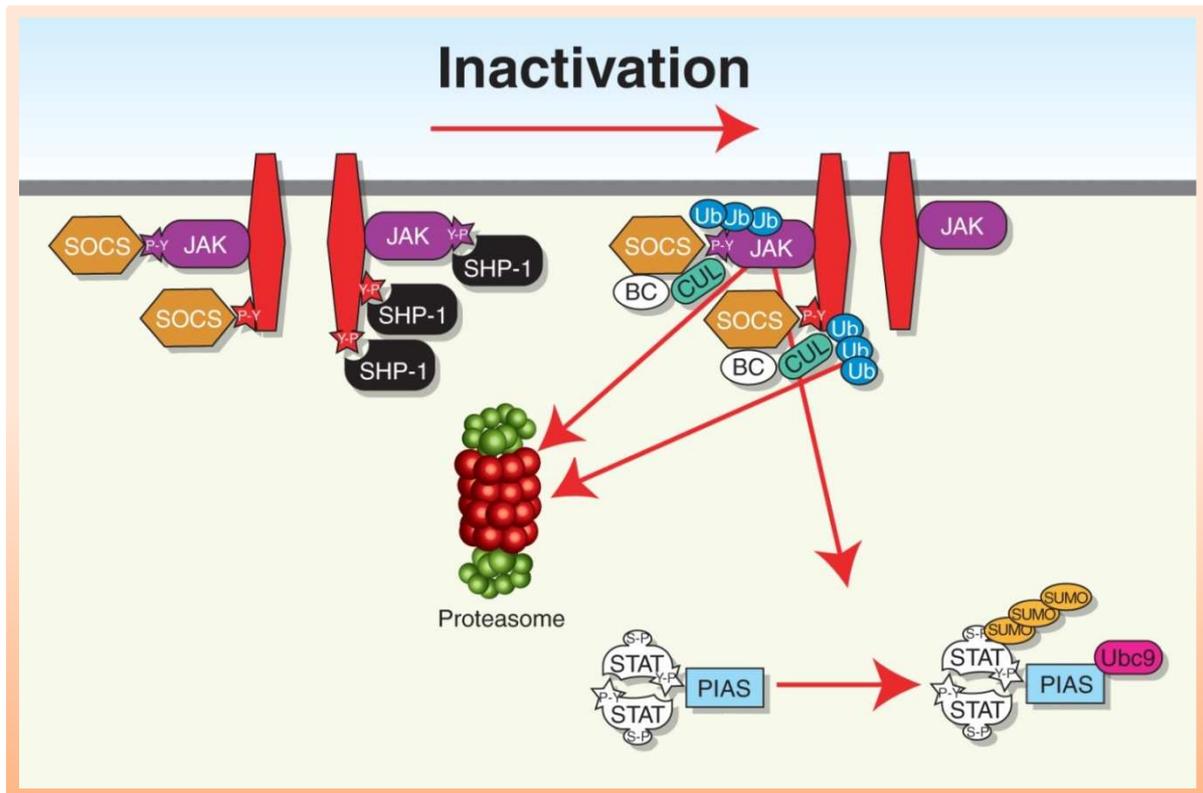
Les protéines SOCS (SOCS1-7) agissent comme un retro-contrôle négatif de la voie de signalisation STAT3. En effet, leur transcription est fortement stimulée par STAT3 après son activation (Yoshimura et al., 2007). Il existe à ce jour 8 protéines de structures similaires appartenant à la famille SOCS. Elles possèdent un domaine SH2 nécessaire à l'interaction avec leurs cibles (e.g. kinases JAK, gp130) et un domaine « SOCS box » qui assure le recrutement du complexe « ubiquitine-transferase ». Ce complexe est composé de l'elongin B, elongin C, cullin-5, RING-box-2 et la ligase E2. Le complexe ubiquitine-transferase présente des fonctions proches de l'ubiquitine ligase E3, et catalyse la dégradation des protéines avec lesquelles il est associé par sa région N-terminal. Cette dégradation massive des protéines JAK et des sous-unités gp130 contient l'activation de STAT3. De plus, les protéines SOCS1 et SOCS3 peuvent agir comme inhibiteurs des fonctions JAK tyrosine kinase via leur domaine « kinase inhibitory region ». Ce domaine riche en résidus tyrosine joue le rôle de pseudo-substrat pour ralentir l'activité des kinases. Si SOCS1 peut interagir avec JAK, il peut aussi s'associer avec les récepteurs aux interférons. En ce qui concerne SOCS3, son interaction est principalement limitée à la sous unité gp130 du récepteur à l'IL-6. SOCS3 est la protéine SOCS la plus importante dans le contrôle de la signalisation STAT3.

### 1.3.2.3 LES PROTEINES PIAS

---

La dernière voie d'inhibition influant STAT3 implique les protéines PIAS (PIAS1, PIAS3, PIASx $\alpha$ , PIASx $\beta$ , and PIASy). A la différence des tyrosines phosphatases ou des protéines

SOCS qui agissent sur les mécanismes précoces de la signalisation (états de phosphorylation, dégradation du récepteur de cytokine), les protéines PIAS interagissent avec les dimères de STAT3 phosphorylés, bloquent leur interaction avec l'ADN et par conséquent leur activité transcriptionnelle. De plus, les protéines PIAS peuvent catalyser l'activité de sumoylation (activité E3 ligase) en transférant les groupes SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) associés à l'enzyme E2 Ubc9 sur la protéine cible. La sumoylation est une modification post-traductionnelle qui grâce au transfert de groupe SUMO sur les résidus lysine de la protéine cible peut altérer ses fonctions. Ainsi, PIAS-3 a été identifié comme étant un inhibiteur spécifique de STAT3 via des mécanismes dépendant de la sumoylation (Chung et al., 1997).



**Figure 18 Régulation de la voie de signalisation de STAT3.**

On compte 3 voies de régulation différentes permettant l'inactivation de STAT3 dans un contexte physiologique. Tout d'abord, les phosphatases (SHP-1) peuvent directement affecter l'état de phosphorylation des partenaires de STAT3 (JAK Kinase, gp130) ou STAT3 lui-même. Deuxièmement, STAT3 active fortement l'expression des protéines de la famille SOCS. Ces protéines assurent un rôle d'« ubiquitine transferase » et catalyse l'ubiquitinylation des JAK Kinases et des chaînes gp130. Les protéines ubiquitinylées sont ensuite dégradées par le protéasome, prévenant l'activation de STAT3. La dernière voie d'inhibition de STAT3 implique les protéines PIAS. Elles interagissent avec le dimère STAT3 et catalysent sa sumoylation. Cette modification prévient l'interaction de STAT3 avec l'ADN. D'après (Rawlings et al., 2004).

---

## 1.4 STAT3 ET POLARISATION DES REPONSES IMMUNITAIRES

Plusieurs études récentes ont montré que les molécules de la famille STAT étaient importantes dans le développement hématopoïétique et la polarisation des réponses immunitaires T CD4<sup>+</sup>. D'une part, l'engagement dans la polarisation Th1 nécessite des mécanismes dépendants de STAT1 et STAT4 comme l'expression de T-bet ou la production d'IFN- $\gamma$ . D'autre part, la polarisation vers la voie Th2 nécessite STAT5 et dans une moindre mesure STAT6 pour l'induction de modifications épigénétiques assurant l'expression stable des cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) (Paul). Pourtant la molécule la plus complexe de cette famille au regard de la différenciation des cellules immunitaires reste le facteur de transcription STAT3. STAT3 est une protéine pléiotropique qui est nécessaire à des signaux aussi bien pro-inflammatoires (IL-6) que anti-inflammatoires (IL-10) et son ambivalence est parfaitement exemplifiée dans les modèles de différenciation T.

### 1.4.1.1 POLARISATION Treg

---

L'importance de STAT3 dans les fonctions et la polarisation des lymphocytes T régulateurs a été dans un premier temps mise en avant dans des modèles murins déficients pour la protéine régulatrice SOCS3, un inhibiteur de STAT3 (Kinjyo et al., 2006). Dans ce modèle, la répression de SOCS3 a induit des productions massives de TGF- $\beta$  et d'IL-10 par les cellules CD4<sup>+</sup>. STAT3 apparaît donc comme une molécule critique pour la production des cytokines anti-inflammatoires associées aux lymphocytes Treg et leurs fonctions effectrices. Par la suite, les études réalisées par Kortylewski en 2005 ont permis d'étayer ces observations. Ils ont utilisés des souris possédant un système hématopoïétique spécifiquement déficient pour la protéine STAT3 (Kortylewski et al., 2005). La protéine STAT3 étant cruciale pour l'embryogenèse (déficiency létale) (Takeda et al., 1997), la mise en place d'un système Mx1-Cre-loxP a permis d'outrepasser ce problème et d'obtenir des résultats intéressants. Les

conséquences de l'ablation de STAT3 dans le système hématopoïétique sont nombreuses (Wang et al., 2004). Premièrement, l'activation constitutive de STAT3 dans les DC semble inhiber leur production de cytokines (IL-12) et leur activation (expression des marqueurs de costimulation CD80/CD86 accrue dans les souris STAT3<sup>-/-</sup>). Deuxièmement, lorsque les souris reçoivent une xéno greffe de cellules tumorales B16, on observe une forte réduction du nombre de lymphocytes T régulateurs infiltrant la tumeur et une forte prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Les lymphocytes T régulateurs sont capables de réprimer les fonctions des cellules lymphocytaires activées par des contacts cellulaires (CTLA-4, IDO) ou des cytokines sécrétées (IL-10, TGF-β). Cette observation semble attester d'un rôle de STAT3 dans la différenciation des Treg. De plus, les lymphocytes T régulateurs infiltrant la tumeur présentent une plus forte activité et une prolifération accrue, renforçant la nécessité de la signalisation STAT3 dans la différenciation Treg. STAT3 peut se lier directement au promoteur des gènes *tgf-beta* et *il-10* ce qui permettrait d'expliquer le lien entre STAT3 et les fonctions suppressives des Treg (Kinjyo et al., 2006). En outre, Pallandre et al. ont par la suite montré que la voie moléculaire de CD28 pouvait employer STAT3. En effet, dans un modèle murin, la stimulation des cellules lymphocytaires CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> par la voie TCR/CD28 a permis d'induire une phosphorylation de STAT3 (Tyr705) dépendante de Lck. Cette activation de STAT3 en présence de TGF-β1 était importante pour l'expression de FoxP3, le facteur de transcription maître de la voie de différenciation des T régulateurs (Pallandre et al., 2007). Ces données sont complétées par Zorn E. et al. qui ont pu mettre en évidence la présence de séquence consensus de STAT3 dans le promoteur de FoxP3 (Chaudhry et al., 2009; Zorn et al., 2006). Une autre étude réalisée par l'équipe de Rudensky a pu démontrer que la signalisation de STAT3 était requise pour les fonctions anti-inflammatoires des lymphocytes Treg, notamment dans le contrôle des colites inflammatoires chroniques (Chaudhry et al., 2009). Dans cette étude, la production de souris Foxp3<sup>Cre/Cre</sup>Stat3<sup>fl/fl</sup> a permis de

spécifiquement réprimer STAT3 dans les Tregs. L'ablation de STAT3 n'affecta pas le nombre total de lymphocytes régulateurs. Pourtant, au cours du temps, les souris déficientes présentèrent une perte de poids, une anémie, un épaississement du colon et périrent entre 12 et 14 semaines. L'ensemble de ces observations, caractéristique de l'IBD, suggèrent que les fonctions immunosuppressives anti-inflammatoires des Treg nécessitent la présence de STAT3. S'il n'est montré aucune influence de STAT3 sur la régulation du gène du TGF- $\beta$ 1 comme précédemment, STAT3 apparaît tout de même critique pour le contrôle des réponses inflammatoires par les Treg. En complément, une étude faite sur l'imatinib mesylate (Gleevec), un inhibiteur de tyrosine kinase utilisé en clinique pour le traitement des leucémies, a permis de conforter l'influence de STAT3 sur les fonctions Treg. Utilisé à des concentrations thérapeutiques, l'imatinib mesylate semble inhiber les fonctions immunosuppressives des Treg ainsi que leur expression de FoxP3 *in vitro*. D'autre part, il réduit significativement l'activation de STAT3 chez les cellules Treg, démontrant le lien mécanistique. Cet effet confère à l'imatinib mesylate un rôle potentiel en tant qu'agent immuno-modulateur (Larmonier et al., 2008). STAT3 semble donc important pour la génération de lymphocytes T régulateurs, leur prolifération et leurs fonctions anti-inflammatoires au cours d'une réponse immunitaire.

#### 1.4.1.2 POLARISATION Th17

---

Alors que STAT3 est impliqué dans la génération des lymphocytes T régulateurs, une autre série de travaux l'implique dans la production et le développement des lymphocytes T inflammatoires Th17 (Harris et al., 2007). Ces cellules Th17 sont retrouvées en grande quantité dans les pathologies auto-immunes (Sclérose multiple, Psoriasis) et jouent un rôle dans le caractère inflammatoire de ces maladies. Il a été démontré dans la littérature la présence de cellules lymphocytaires Th17 dans certains tissus. Chez la souris, la stimulation

de lymphocytes récupérés de différentes localisations (Plaques Peyer, GL, MO) induit une production d'IL-17 de quantité variable. Pourtant, l'ablation de STAT3 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a montré une absence totale de lymphocytes produisant de l'IL-17 après stimulation pendant 4h en PMA et ionomycine (Harris et al., 2007). Puisque les lymphocytes Th17 sont associés au développement de maladies auto-immunitaires telles que l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) ou la pneumopathie auto-immune, certaines équipes ont développé des modèles d'études pour évaluer le rôle de STAT3. L'induction de ces maladies dépendantes des cellules Th17 chez les souris possédant des lymphocytes CD4<sup>+</sup> STAT3<sup>-/-</sup> a montré une progression ralentie des maladies en comparaison des souris sauvages, confirmant le rôle de STAT3 dans le développement *in vivo* des lymphocytes Th17. La différenciation Th17 nécessite la présence de l'IL-6 et du TGF-β *in vitro* (Mangan et al., 2006), deux cytokines intrinsèquement liées à STAT3, qui favorise l'expression d'IL-21 par les T CD4<sup>+</sup> naïfs (Zhou et al., 2007). Plus tardivement, ces lymphocytes « précurseurs » Th17 expriment les récepteurs à l'IL-21 et l'IL-23. La signalisation par les récepteurs à l'IL-21 et l'IL-6, nécessitant STAT3, permet l'induction de RORγ et RORα, les facteurs de transcription maîtres de la voie Th17. Leur action permet la différenciation terminale et les modifications épigénétiques nécessaires pour l'obtention des lymphocytes Th17 (Yang et al., 2008b).

La production de lymphocytes T régulateurs ou de lymphocytes Th17 inflammatoires est par conséquent dépendante de facteurs communs (TGF-β). Des études ont par ailleurs montré grâce à des modèles murins de différenciation utilisant des fluorescences RFP associés à l'IL17A et GFP associés à FoxP3 que des clones doubles positifs (RFP<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>) étaient présents au sein d'une même cellule. La différenciation terminale dans l'une des deux voies est par conséquent fortement dépendante des cytokines présentes dans le microenvironnement et leur proportion.

**Tableau 2 - STAT3 est lié aux signalisations critiques pour les voies Th17/Treg.**

Les cytokines associées au développement des réponses Th17 et Treg sont majoritairement opposées dans leur effet sur les lymphocytes T naïfs. La plupart de ces cytokines sont néanmoins associées à STAT3 qui assurent la transduction du signal ou induits leur transcription.

Cytokines	Voie Th17	Voie Treg	Remarques
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	+	-	
<b>IL-6</b>	-	+	Signalisation par STAT3
<b>IL-21</b>	++	- -	Signalisation par STAT3
<b>IL-23</b>	++	- -	Signalisation par STAT3
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	+	+++	Induction par STAT3

Comme on peut le voir dans le tableau ci-dessus, une grande partie des cytokines présentes dans le microenvironnement inflammatoire utilise STAT3 pour sa propre signalisation ou est produite suite à la signalisation de STAT3. Ce dernier est donc un élément clé et ambivalent dans le choix de l'orientation Th17/Treg.

Par exemple, L'IL-6 permet l'induction de la différenciation Th17 par un signal dépendant de STAT3 et la production des cytokines IL-21 et IL-23 par les cellules T naïves. Ces trois cytokines répriment l'expression de FoxP3 mais également T-bet afin de favoriser la voie Th17 en prévenant la différenciation Th1 et Treg (Mus et al.). Le TGF- $\beta$ 1 est capable d'induire l'expression de FoxP3 via SMAD4 et va à l'encontre des signalisations de ROR $\gamma$  et ROR $\alpha$  (Yang et al., 2008a). L'IL-6 est capable d'orienter des lymphocytes T régulateurs différenciés en cellules Th17 (Bettelli et al., 2006). Plus récemment, l'équipe de Rudensky a montré le rôle qu'avait STAT3 dans les fonctions des Treg dirigés contre les Th17. Ils ont pu clairement expliquer l'association entre P<sup>+</sup>-STAT3 et FoxP3 était observable chez les Treg. Cette association est nécessaire aux fonctions des Treg puisque l'ablation de STAT3 est létale pour les souris atteintes de colite inflammatoires. Cette maladie associée au lymphocyte Th17

peut être contrôlée dans des conditions physiologiques par les facultés anti-inflammatoires des Treg et notamment leur production d'IL-35 et d'IL-10 (Rubtsov et al., 2008). L'ablation de STAT3 a montré une forte déficience dans la production de ces cytokines sans altérer les fonctions suppressives antiprolifératives des Treg comme l'expression du CTLA-4 ou la production de TGF- $\beta$ . STAT3 gouverne donc spécifiquement des voies dédiées au contrôle des réponses inflammatoires produites par les fonctions des lymphocytes Th17 (Chaudhry et al., 2009).

On observe une compétition entre les cytokines clés des voies de signalisation conduisant à la production de Th17 et de Treg. Ces cytokines nécessitent STAT3 pour induire leurs signaux ce qui confère à STAT3 un rôle prépondérant dans le choix entre ces deux voies de différenciation ambivalentes (Figure 19). Par conséquent, l'activité transcriptionnelle de STAT3 peut influencer de nombreux gènes en fonction des paramètres extrinsèques à la cellule. Une même voie de signalisation peut alors engendrer des réponses cellulaires différentes.

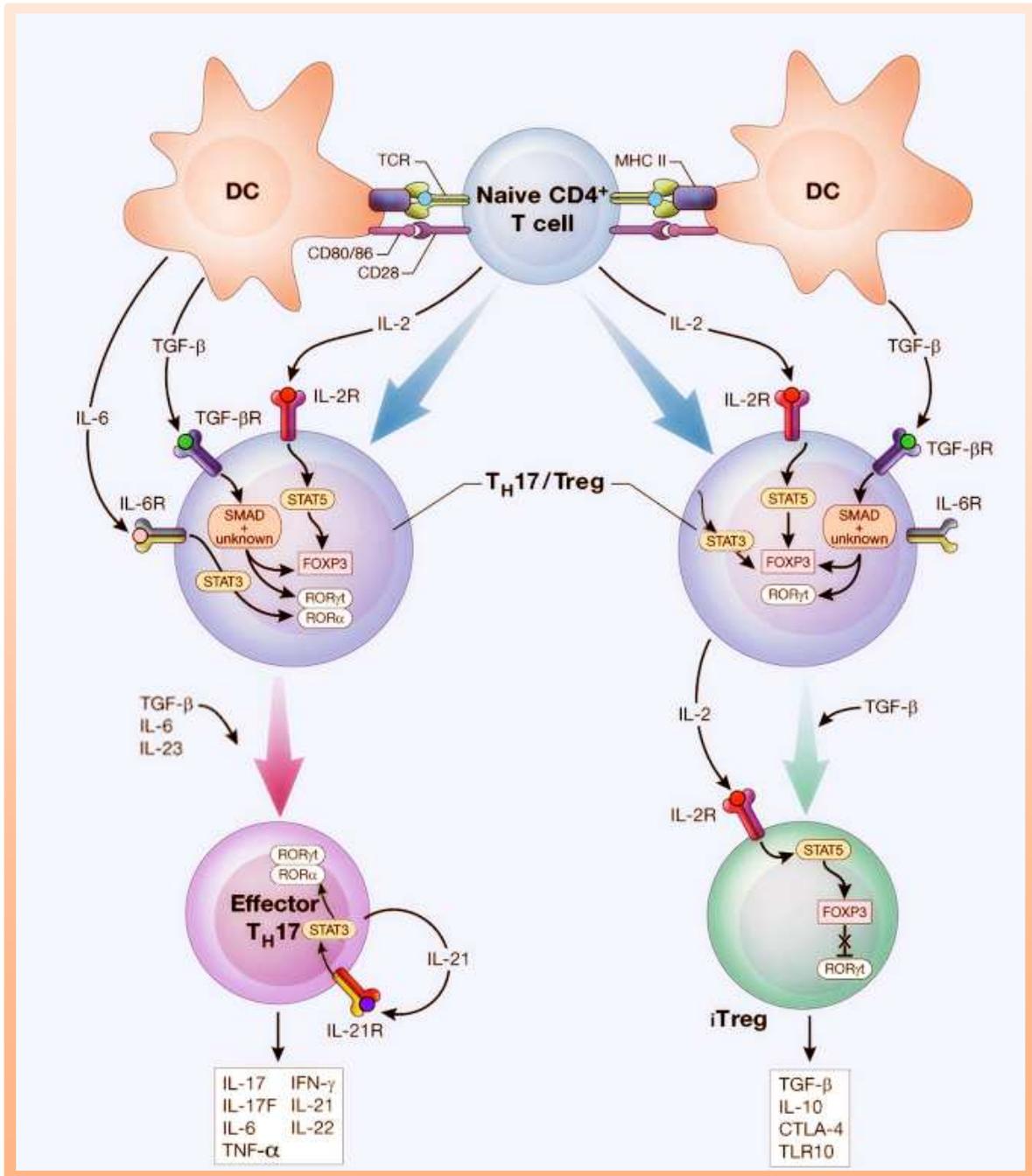


Figure 19 – STAT3 à l'intersection des différenciations Th17 et Treg.

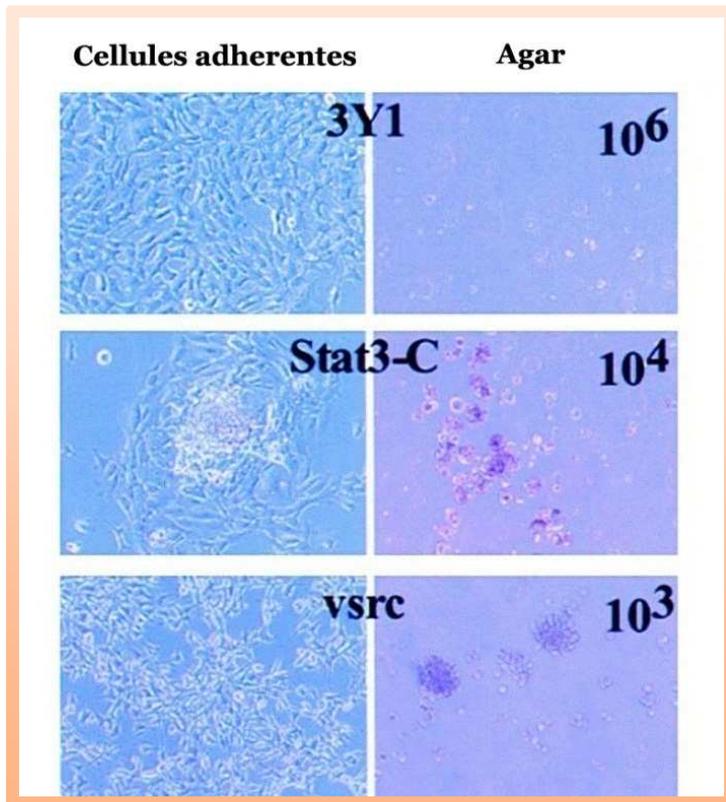
La différenciation en Th17 ou Treg périphérique (iTreg) requiert obligatoirement un signal provenant du TGF-β. Après l'activation du lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf, les signaux issus du TGF-β, de l'IL-2 et du TCR génèrent un « précurseur » Treg/Th17 caractérisé par l'expression conjointe de Foxp3 et ROR-γt. Une stimulation prolongée par le TGF-β favorise la différenciation en Treg alors que la présence d'IL-6 oriente le précurseur vers la voie des Th17. L'IL-6 inhibe la production de FoxP3 et restreint ainsi le développement vers la voie Th17. Les facteurs de transcriptions ROR-γt et RORα induisent l'expression des récepteurs à l'IL-21 et l'IL-23 par des mécanismes dépendants de STAT3. La signalisation soutenue par le récepteur à l'IL-23 semble être requise pour permettre la différenciation terminale Th17. Adapté de (Egwuagu, 2009).

L'expression de STAT3 est ubiquitaire et les nombreux mécanismes de régulation le concernant soulignent parfaitement l'importance d'un contrôle précis de sa signalisation. En dépit de ces étapes de contrôles, de nombreuses données dans la littérature démontrent un dérèglement des fonctions associées à STAT3 pouvant conduire au développement cancéreux (Bromberg et al., 1999).

---

## 1.5 FONCTIONS ONCOGENIQUES DE STAT3

A la fin des années 1990, alors que les molécules de la famille STAT étaient principalement décrites dans la signalisation physiologique de nombreuses cytokines, des rapports établirent leurs présences dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales, lignées immortalisées ou dans les échantillons de cancers issus de patients. Ainsi, les cellules transformées par l'oncoprotéine Src présentaient une activité STAT3 accrue par rapport aux cellules saines, impliquant STAT3 dans la transformation dépendante de Src (Yu et al., 1995). Une grande proportion de cancer squameux présentent une activité aberrante de STAT3, très probablement due à l'activation excessive du récepteur à l'EGF (Grandis et al., 1998). Finalement, les travaux de Bromberg ont confirmé les propriétés oncogéniques de STAT3 grâce à l'utilisation d'une forme constitutivement active du FT (STAT3-C). Dans leurs expériences, la transfection des fibroblastes immortalisés 3Y1 par un vecteur d'expression de STAT3-C se traduisait par l'acquisition de propriétés tumorigeniques comme la formation de colonies en milieu semi-liquide (Figure 20).Après les démonstrations de Yu. et al. et Bromberg et al sur le rôle oncogénique de STAT3 (Bromberg et al., 1998; Yu et al., 1995), d'autre étude ont associé STAT3 à la transformation oncogénique. Par exemple, STAT3 est stimulé au cours de la transformation tumorale accompagnant l'infection virale par l'HCV (Yoshida et al., 2002), par le Virus T-lymphotropique humain (HTLV) (Migone et al., 1995) ou encore l'antigène moyen T du virus polyoma (Garcia et al., 1997).



**Figure 20 – STAT3 présente des propriétés oncogéniques.**

Des cellules fibroblastiques 3Y1 ont été transformées par un vecteur exprimant src, STAT3-C ou un vecteur contrôle. Les cellules sont mises en plaques 6 puits ou dans des cultures en agar. Les cellules transfectées par STAT3-C prolifèrent plus fortement que les cellules contrôles et sont capables de former des colonies en agar (Adapté de (Bromberg et al., 1999)).

On sait dorénavant que STAT3 est activé de manière constitutive dans des cancers d'origines variées comme dans les cancers du sein (Garcia et al., 1997), de la prostate (Dhir et al., 2002), de la peau (Niu et al., 2002a) ou du colon (Corvinus et al., 2005). Les études de cohortes confirment que l'expression d'une forme active de STAT3 (forme phosphorylée) est corrélée à un mauvais pronostic et une survie plus faible pour les patients atteints de carcinomes des cellules squameuses (Shah et al., 2006), d'adénocarcinomes gastriques (Lee et al., 2009), de cancers colorectaux (Kusaba et al., 2006) ou encore de cancer du sein (Rosen et al., 2006). Ainsi, STAT3 est présent en grande quantité et joue un rôle critique dans les propriétés tumorigéniques des cellules affectées. STAT3 possède une action intrinsèque mais aussi extrinsèque à la cellule tumorale en influençant l'environnement dans lequel elle évolue.

### 1.5.1 FONCTIONS PRO-TUMORALES INTRINSEQUES DE STAT3

L'activation de STAT3 au cours de la transformation tumorale favorise les signaux de survie. STAT3 peut directement induire l'expression de bcl-x1 (Catlett-Falcone et al., 1999)(204,205), bcl-2 (206) ou encore la survivine (Mahboubi et al., 2001) et compenser les signaux pro-apoptotiques qui devraient détruire les cellules instables et potentiellement dangereuses. Le cycle cellulaire est activé par STAT3 et notamment la cycline D1 (Masuda et al., 2002) qui favorise l'entrée des cellules en phases de prolifération. L'ensemble de ces propriétés sont importantes pour la promotion cancéreuse associée à STAT3.

STAT3 est aussi capable d'affecter l'angiogénèse tumorale. L'activation constitutive de STAT3 augmente l'expression du VEGF (Niu et al., 2002b). L'importance de STAT3 dans l'angiogénèse a pu être étayée par des modèles utilisant des siRNA ciblant STAT3. Dans ce contexte, les cellules transgéniques obtenues produisent moins de VEGF et une répression de la croissance tumorale était observée (Li et al., 2006). D'autres données montrent un rôle de STAT3 dans l'induction de Hepatocyte Growth Factor (HGF) dans le cancer du sein (Hung and Elliott, 2001) et du Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) dans les mélanomes (Xie et al., 2006), deux molécules fortement impliquées dans l'angiogénèse.

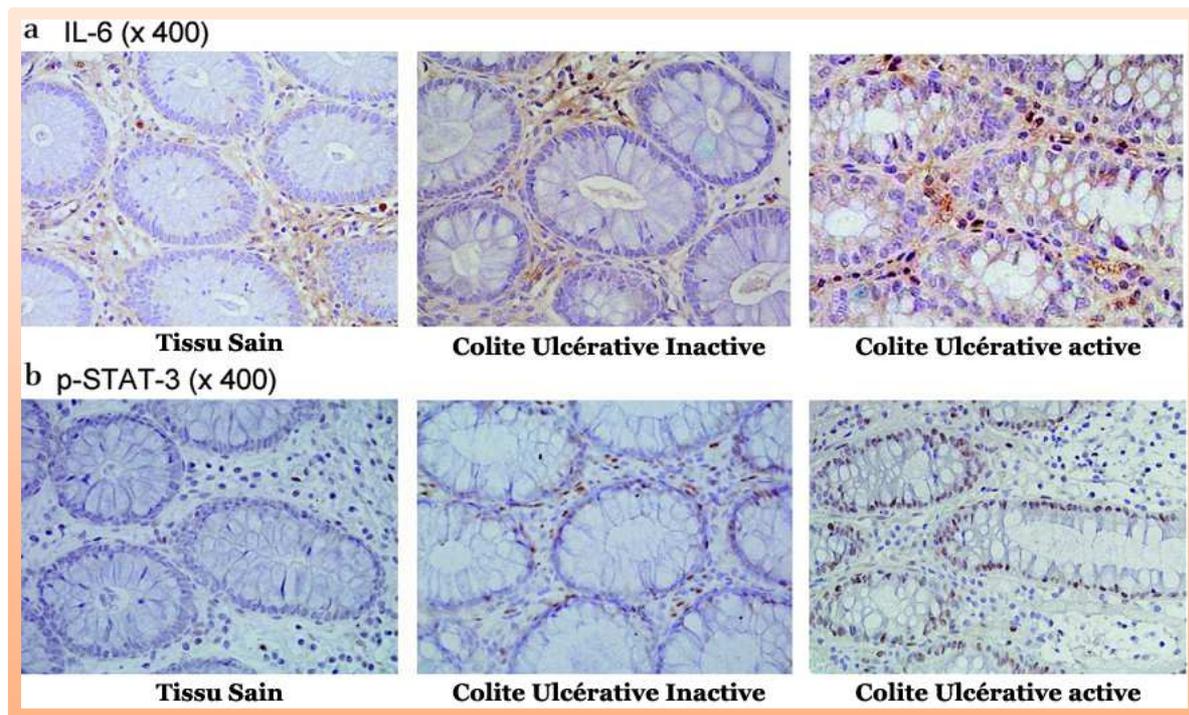
Enfin, le dernier point permettant de qualifier le rôle de STAT3 dans la tumorigénèse intrinsèque concerne les preuves de son implication dans les mécanismes de métastase et d'invasion cellulaire (Dien et al., 2006; Kataoka et al., 2008). A titre d'exemple, l'activation de STAT3 régule l'expression de MMP-2 et MMP1 (Itoh et al., 2006; Xie et al., 2004). Ces endopeptidases zinc-dépendantes dégradent les éléments de la matrice extra-cellulaire, favorisant la libération des cellules tumorales de la structure matricielle et accentuant leur caractère invasif. STAT3 augmente la transcription de MMP-2. La répression de STAT3 entraîne une répression significative de l'invasion tumorale dans des modèles de xénogreffes

murines. De plus, STAT3 peut influencer les protéines impliquées dans les propriétés métastatiques du cancer comme TWIST (Yang et al., 2004). TWIST est un facteur de transcription directement impliqué dans la motilité cellulaire et la régulation négative des interactions E-cadherine, contribuant aux propriétés invasives du cancer (Cheng et al., 2008).

---

### 1.5.2 FONCTIONS PRO-TUMORALES EXTRINSEQUES DE STAT3

De nombreuses études ont souligné l'importance de l'inflammation dans l'initiation et la progression tumorale (Bernstein et al., 2001; Smalley and DuBois, 1997). Il a été démontré une incidence de cancer colorectal (CRC) plus élevée chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques intestinales (Colites ulcéraives, Maladie de Crohn). En outre, l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires pour traiter ces patients est corrélée à une diminution notable (40-50%) du risque relatif de CRC, renforçant l'implication de ces processus dans la genèse tumorale. Les conditions inflammatoires peuvent initier et promouvoir la transformation oncogénique via la production de nombreux facteurs solubles. Il a été montré que les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 étaient prédominantes dans le développement des maladies pro-inflammatoires comme la colite ulcéraive (Figure 21) (Li et al.).



**Figure 21–Analyse en IHC de biopsies de patients sains, de patients atteint de Colite Ulcération active et de Colite Ulcération inactive.**

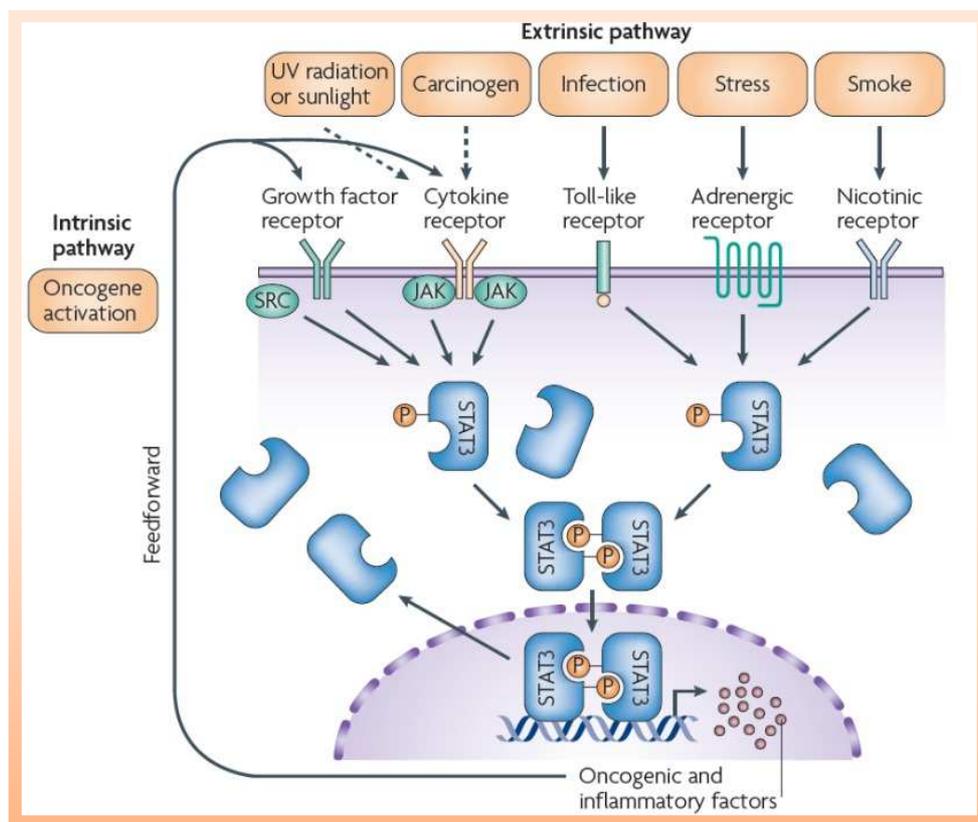
Le nombre de cellules marquées en IHC pour l'IL-6 et P<sup>+</sup>-STAT3 est significativement plus important chez les patients atteints de colite ulcération active par rapport aux tissus sains ou au Colite Ulcération inactive. Adapté de (Li et al.).

La présence de STAT3 dans les signalisations inflammatoires suggère une activation accrue du FT au site de l'inflammation comme il a été montré dans certaines études (Figure 21). En outre, la présence de STAT3 semble critique pour le développement de l'UC. En effet, des études sur les polymorphismes de STAT3 ont montré une corrélation entre certaines SNP de STAT3 et une plus grande susceptibilité des patients à la UC (Franke et al., 2008) et l'IBD et aux scléroses multiples (Cenit et al.).

STAT3 a donc été révélé comme étant un élément crucial de l'induction et la maintenance d'un environnement inflammatoire chronique (Bollrath et al., 2009; Grivennikov et al., 2009; Kortylewski et al., 2009b). En outre, l'équipe de Bollrath à démontré que STAT3 était



Le mécanisme expliquant l'action de STAT3 dans les mécanismes de CAC a par la suite été élucidé. STAT3 stimule l'expression de cytokines inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23) et de facteurs de croissance (EGF, PDGF) qui en retour nécessitent STAT3 pour leur voie de signalisation ; une boucle d'activation permanente va s'établir dans l'environnement cellulaire. De par son implication dans les processus oncogéniques (stimulation de la prolifération et de la survie cellulaire), STAT3 agit alors comme un lien intrinsèque entre inflammation chronique et carcinogénèse (Figure 23).



**Figure 23 - STAT3 crée un lien entre inflammation et oncogénèse.**

L'inflammation et le cancer sont liés par des voies oncogéniques (intrinsèques) et environnementales (extrinsèques). La voie intrinsèque est activée dans les cellules en cours de transformation. Il y a surexpression de récepteur aux facteurs de croissance et cytokines. Ces récepteurs peuvent être fortement stimulés par les facteurs environnementaux associés à l'inflammation pro-oncogénique i.e. radiation UV, infection, stress,...). Leur activation entraîne la stimulation de STAT3. En plus des gènes pro-oncogéniques, STAT3 induit l'expression de nombreux médiateurs de l'inflammation (IL-6) qui le nécessite pour signaler. Plus particulièrement, ces récepteurs stimulent l'activation de STAT3. Pour finir, il s'établit des boucles d'activation autocrines et paracrines stables qui favorisent une inflammation pro-carcinogène. D'après (Yu et al., 2009).

Par conséquent les cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ ), chémokines et autres médiateurs de l'inflammation (M-CSF, prostaglandines) induisant STAT3 au cours de leur signalisation sont indispensables à la maintenance d'un environnement inflammatoire chronique pro-oncogénique. Il est important de remarquer que si l'ablation de STAT3 ne prévient en aucun cas les phénomènes liés à l'inflammation, notamment par la redondance de signalisation (STAT1, NF $\kappa$ B), on ne retrouve plus les risques de cancers associés à de telles pathologies (Bollrath et al., 2009). Bien que certaines cellules tumorales puissent produire les cytokines pro-inflammatoires décrites précédemment, elles sont principalement produites par les cellules stromales inflammatoires (CSI) (cellules myéloïdes, cellules endothéliales) et les cellules immunitaires infiltrantes (CII) (Kortylewski et al., 2005; Kortylewski et al., 2009b; Kujawski et al., 2008; Wang et al., 2009a).

De plus, l'activation perpétuelle de STAT3 dans les cellules tumorales est par la suite diffusée aux CSI et CII. Ceci s'explique par le fait que STAT3 va stimuler la production de cytokines, chémokines et facteurs de croissances qui en retour, après sécrétion dans l'environnement, stimuleront l'activation de STAT3 dans les CSI et CII. Cette boucle d'activation implique les cellules tumorales, les CSI non tumorales et les CII (Yu et al., 2007). Une telle boucle de signalisation a été observée dans des études portées sur les myélomes multiples (MM) (Shain et al., 2009). Dans les cellules de MM, l'IL-6 initie l'activation de la kinase JAK et de STAT3, conduisant à la survie de la cellule via la transcription de gènes anti-apoptotiques. L'activation de STAT3 est aussi observée dans les cellules stromales de MM qui sont la source majeure d'IL-6, favorisant la signalisation STAT3 chez les cellules de MM et complétant la boucle d'activation. Bien que la source initiale d'IL-6 ne soit pas connue, la boucle de signalisation paracrine et/ou autocrine formée par la sécrétion de cytokines inflammatoires et la voie STAT3 est un élément retrouvé dans de nombreux cancers.

Les travaux de Kortylewski ont présenté plus clairement le rôle que jouait STAT3 dans l'évolution de l'environnement inflammatoire pro-tumoral. Leurs travaux démontrent que la signalisation de STAT3 peut faire évoluer l'inflammation d'un profil anti-tumoral par la sécrétion de grande quantité d'IL-12 par les DC tumorales vers un profil pro-tumoral caractérisé par la production d'IL-23 par les macrophages infiltrant la tumeur. Plus précisément, ils ont réalisé des greffes de cellules tumorales B16 chez des souris possédant un système immunitaire déficient pour STAT3. Ils observèrent une augmentation importante de la sécrétion d'IL-12 par les DC infiltrantes associée à la levée d'inhibition de la transcription du gène IL-12-p35 par STAT3. De plus, ils démontrent un effet direct de STAT3 sur l'activation du gène IL-23/p19 puisque la répression de STAT3 abrogeait la production d'IL-23 par les cellules myéloïdes tumorales (Kortylewski et al., 2009b). Ces effets sont également observables sur les cellules tumorales même si les amplitudes de sécrétion restent en deçà de celles associées aux DC et macrophages infiltrants. Une observation inattendue dans cette étude est l'expression du récepteur à l'IL-23 par les cellules Treg. Cette donnée vient renforcer la notion de plasticité de la polarisation lymphocytaire comme il a été vu précédemment avec la présence d'un précurseur double positif Treg/Th17. De plus, la neutralisation de ce récepteur *in vivo* confirme sa fonctionnalité. En effet, lorsque l'IL-23R est bloqué chez les souris greffées en tumeur B16, la progression tumorale est ralentie et le nombre de Treg infiltrant est fortement diminué. Enfin, la stimulation des Treg par l'IL-23 active la phosphorylation de STAT3 et confirme l'importance de celui-ci dans les fonctions Treg associés à l'IL-23. STAT3 est donc au centre de la balance entre l'IL-12 et l'IL-23 et permet ainsi l'établissement d'un environnement favorable à la prolifération cancéreuse. D'autre part, L'IL-23 est une cytokine favorisant les lymphocytes Th17, des cellules pro-inflammatoires et pro-carcinogènes, il apparaît de plus en plus évident que STAT3 est une molécule critique dans l'évolution tumorale.

La découverte du rôle majeur de STAT3 dans la carcinogénèse induite au cours de l'inflammation a permis de mieux comprendre les mécanismes d'action de certains agents infectieux présentant un potentiel oncogénique. Par exemple, l'infection par *Helicobacter Pylori*, associée à de forte inflammation gastrique et une incidence de cancer colorectal (CRC) accrue, active STAT3 à travers la sécrétion d'une protéine nommée cytotoxin-associated gene A (CagA) et reconnue par la cellule cible (Bronte-Tinkew et al., 2009). De nombreux virus peuvent aussi affecter l'activité de STAT3 comme les virus HBV, HPV ou encore HTLV (Choudhari et al., 2007; Migone et al., 1995; Sun and Steinberg, 2002).

A terme, il est souvent observé une activation excessive et chronique de STAT3 voire l'établissement d'une boucle de signalisation intrinsèque stable et dissociée des cytokines inflammatoires. On peut citer l'activation directe de STAT3 par la kinase Src mutée, la production d'une chaîne gp130 constitutivement active dans les carcinomes hépatocellulaires (Rebouissou et al., 2009) ou encore la mutation de JAK2 dans certains cas de leucémies myéloïdes (Olcaydu et al., 2009). Ces modifications ont été étudiées et souvent associées à des mécanismes épigénétiques directement liés aux dérégulations géniques excessives observées dans ces environnements (Zhang et al., 2007). A cet égard, il est important de noter que STAT3 peut promouvoir la méthylation d'ADN et pourrait donc directement jouer sur ces mécanismes épigénétiques (Zhang et al., 2005).

Ce travail a été présenté sous la forme d'une communication oral à :

**6th International Symposium on Targeted Anticancer Therapies (Bethesda, MD, USA, March 20-22, 2008).** **Bedel R.**, Thiery-Vuillemin A, Borel C, Remy-Martin J-P, Palandre J-R, Gounand M, Grandclement C, Tiberghien P, Pivot X, Borg C. A novel role of STAT3 in NK cell-immunosurveillance subversion.

### 2.1 INTRODUCTION A LA PUBLICATION

Parmi les récepteurs activateurs NK, NKG2D, reconnaissant les molécules de CMH I non classique MICA, MICB et les protéines ULBP, est un acteur majeur dans les fonctions anti-tumoral des lymphocytes NK. En effet, l'injection de lignées tumorales exprimant de manière ectopique certaines NKG2DL entraine un rejet *in vivo* dépendant de NKG2D. En outre, une étude récente de Guerra N. a mis en avant l'importance de NKG2D dans l'immunoédition des tumeurs. Dans un modèle de cancer de la prostate TRAMP initié chez des souris NKG2D<sup>-/-</sup>, les carcinomes isolés présentent une expression élevée des NKG2DL, ce qui n'est pas le cas des carcinomes agressifs émergents chez les souris sauvages. NKG2D apparaît donc comme une molécule clé dans les fonctions d'immunosurveillance NK et l'immunoédition qui en résulte. De plus, ces observations suggèrent que les voies oncogéniques associées à la progression tumorale pourraient favoriser une régulation négative des NKG2DL. STAT3 est un facteur de transcription qui possède des propriétés oncogéniques, il peut moduler l'expression de protéines anti-inflammatoires (TGF- $\beta$ 1 et IL-10) et joue un rôle critique dans l'incidence accrue de CAC. La prépondérance de STAT3 dans l'émergence des tumeurs malignes au sein d'un environnement pro-inflammatoires en fait un candidat de choix pour

notre étude sur l'immunosurveillance NK. Au cours de ce travail, nous avons choisi d'évaluer l'implication de l'activation de STAT3 dans les cellules tumorales sur l'expression de NKG2DL et la reconnaissance des cellules tumorales par les NK.

## **A novel role of STAT3 in MICA transcriptional regulation**

Romain Bedel<sup>1,2,3,\*</sup>, Antoine Thiery-Vuillemin<sup>1,2,4,\*</sup>, Camille Grandclement<sup>1,2,3</sup>, Jeremy Balland<sup>1,2,3</sup>, Jean-Paul Remy-Martin<sup>1,2,3</sup>, Bernadette Kantelip<sup>5</sup>, Jean-René Pallandre<sup>1,2,3</sup>, Xavier Pivot<sup>1,2,4</sup>, Christophe Ferrand<sup>1,2,3</sup>, Pierre Tiberghien<sup>1,2,3</sup>, Christophe Borg<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR 645, F-25020, Besançon, France ; <sup>2</sup>University of Franche-Comté, IFR133, F-25020 Besançon, France; <sup>3</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté F-25020, Besançon, France; <sup>4</sup>Department of Medical Oncology, CHU Besançon, 25000 Besançon, France; <sup>5</sup>Department of pathology, CHU Besançon, 25000 Besançon, France.

\* Both authors equally contributed to this work

**Running title: STAT3 negatively regulates MICA transcription.**

**Keywords: MICA, NKG2D, Immunosurveillance, STAT3, NK.**

**Footnotes:** R.B. has received a fellowship from the conseil regional de Franche Comté. This work has been supported by the “Ligue contre le cancer inter-regionale-Grand Est”, associations Laurette Fugain and cent pour sang la vie.

Author’s contributions: C.B. designed the research, analyzed experiments and wrote the manuscript, R.B., C.G., J.B., J.P.R.M., B.K. and A.T.V. performed research and analyzed experiments. C.F., X.P., P.T., contributed to the design and writing.

Correspondence to: [christophe.borg@efs.sante.fr](mailto:christophe.borg@efs.sante.fr)

**Abstract:** The role of NKG2D-expressing Natural Killer (NK) cells in tumor immune surveillance is now well established. Nevertheless, tumor progression occurs despite tumor immune surveillance leading to cancer persistence in immune competent hosts. The Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) plays a pivotal role both in oncogenic functions and immune suppression. Then, we decided to investigate the role of STAT3 in NK cell-immunosurveillance subversion.

To initiate this study, we first selected a colorectal cancer cell line (HT29) poorly able to activate NK and constitutively expressing an active form of STAT3. STAT3 neutralization in HT29, using pharmacological inhibitors or siRNA, resulted in an increase of NK degranulation and IFN- $\gamma$  production. This ability was partially restored in the presence of NKG2D neutralizing antibodies, suggesting that STAT3 activation in HT29 prevents NKG2D-mediated NK cell activation. Therefore we investigated the expression of NKG2D ligands according to STAT3 activation in HT29, mesenchymal stem cells and activated-lymphocytes. Using quantitative real-time PCR, western blotting and flow-cytometry analyses, we observed that MHC class-I-chain-related protein A (MICA) was up-regulated following STAT3 neutralization. A direct interaction between STAT3 and MICA promoter was identified. Since a cross-talk between DNA damage repair mechanism and NKG2D ligand expression was recently demonstrated, we investigated the influence of STAT3 in these settings. STAT3 was shown to negatively regulate MICA expression in colon cancer cell line and mesenchymal stem cell following irradiation or heat shock exposition and in lymphocytes following CD3/CD28-mediated activation. Here we characterize a novel role of STAT3 in MICA expression regulation.

## Introduction

The immune system can detect and suppress emerging tumors (1). In addition to their role in pathogen immunity, Natural Killer cells (NK) have been implicated in tumor surveillance in both mice and human models (1-6). Among NK activating receptors, Natural Killer Group 2, member D receptor (NKG2D), is a C-type lectin-like transmembrane glycoprotein recognizing self-molecules (referred as NKG2D ligands; NKG2DLs) that emerged as a pivotal signaling pathway supporting cancer immune surveillance. Indeed, transfected tumor cell lines expressing NKG2DLs are rejected *in vivo* in an NKG2D-dependent manner (7, 8).

Recently, generation of NKG2D-deficient mice confirmed the critical role of these stimulatory NK receptors in immune surveillance of spontaneous prostate cancer and lymphoma models (9). Contrary to prostate cancer arising in NKG2D-deficient mice, tumor cells isolated from fast-growing carcinoma in control mice (and not in smaller late-arising tumors) lacked NKG2DLs, suggesting a NKG2D-dependent immune editing (9) and supporting the hypothesis that oncogenic pathways associated with cancer progression might negatively regulate NKG2DLs.

MHC class I chain related A and B (MICA and MICB) or ULBP proteins (7, 10, 11) are NKG2DLs, weakly expressed on normal cells and up-regulated in cancers (12-16). Nonetheless, molecular mechanisms leading to NKG2DLs regulation are poorly defined.

The enhanced incidence of colorectal cancer (CRC) in patients affected by inflammatory bowel disease (IBD) had established chronic inflammation as a corner stone mechanism in tumor suppressor checkpoint subversion (17, 18). Particularly, interleukin 23 (IL-23) was shown to increase tumor incidence in mice (19) and to decrease cancer immune surveillance

through signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) (20). STAT3 is a transcription factor activated in IBD (21-23) and directly involved both in intestinal inflammation and cancer progression (24, 25).

In the present study, we aimed to investigate the role of STAT3 activation in the regulation of NKG2DLs expression and recognition of tumor cells by NK. We showed that STAT3 ablation in tumor cells modulates NKG2D mediated NK cell activation. Activated STAT3 interacts with MICA promoter to drive MICA transcription. These results shed light on the negative regulation exerted by STAT3 on MICA expression in different cell types submitted to DNA damages or cellular stress.

## **Materials and Methods**

### **Reagents**

The following antibodies were used: anti-human MICA (BZ-26) (Diaclone, Besançon, France); anti-human CD107a (LAMP-1) (H4A3), isotype PE (MOPC-21) (BD Biosciences, Le Pont de Clay, France); anti-MICA-PE (2C10), MICB (9847-1), ULBP1 (Z-9), ULBP2 (F16), ULBP3 (2F9), TGF- $\beta$ 1 (C-16) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-human STAT3 (79D7) and phospho-Stat3 (Tyr705) (3E2) (Cell Signaling, Beverly, USA). STA-21, a selective inhibitor of STAT3 was purchased from BIOMOL International (Plymouth, USA). Oncostatin M (Peprotech, France) was used in some experiments. The TGF- $\beta$ 1 receptor inhibitor SB-431542 (Tocris Biosciences, Bristol, UK) was used in some experiments. Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) were used for stimulation of PBL.

### **Cell lines and primary cells cultures.**

HT29 (ATCC, HTB-38), SW620 (ATCC, CCL-227), Colo320 (ATCC, CCL-220), K562 (ATCC, CCL-243) and 293T (DSMZ, ACC-635) cells were verified by morphology, tested for mycoplasma and conserved in master cell bank upon reception. Cells were never used above passage 10. The stroma cell line SV56 was established as previously described (26). Cells were maintained in either RPMI 1640 (K562 and SV56) or DMEM (HT29, SW620 and Colo320) medium (Lonza, Paris, France) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). NK were purified from healthy donor peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using a negative magnetic selection (Stem Cell, Vancouver, Canada). The purity of CD56/CD3 NK cells was assessed by flow cytometry and ranged from

90% to 98%. NK cells were maintained in RPMI 1640 Medium (Lonza, Paris, France) supplemented with 10% Human Serum (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

### **RNA silencing and plasmids constructs**

Specific STAT3 siRNA ( sense 5'-AAAGAACTTCAGACCCGTCAACAAA-3', anti-sense 5' AAAATTTGTTGACGGGTCTGAAGTT-3') and scramble siRNA ( sense 5'-AAAGGAGGGGCATGCCACGTTGG-3', anti-sense 5'-AAAACCAACGTGGCATGCCCTC8 3') sequences were produced, annealed and cloned into the BbsI site of the 3' LTR of pFIV-H1/U6 vector according to manufacturer's instructions (System Biosciences, Mountain View, CA). Lentiviral supernatant production and subsequent infection of cell lines were realized according to manufacturer's instructions. Human STAT3C in pBABE vector was provided by Dr J Bromberg (27). pGL3-MICA-pro vector was previously described and kindly given by Dr. Jack D. Bui (28).

### **Site-directed Mutagenesis**

STAT3 binding Site-directed mutagenesis was performed according to manufacturer's protocol (QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, USA). Four base pairs within the STAT3 binding site were predicted to disrupt STAT3 binding, when mutated, without introducing or removing other binding sites. These changes were as follows: (T/C) (T/G) (C/A) (C/T) turning the normal TTCCTTCCAGGAC STAT3 consensus binding sequence into TTCCCGATAGGAC. Two primers were designed to generate the mutated STAT3 binding site in the MICA promoter region of the pGL3 MICA vector. The sequences were the following: Muta-MICA-sense 5'-cgcggttgctgtcctgtaaggaacaagccagtg-3' Muta-MICA-anti-sense 5'-cactggcttgcttaccaggacagacaacgcg-3'. Sequencing of the resulting pGL3 MICA mut vector confirmed the mutation in the binding site (Supplementary Data 1).

### **Real Time-quantitative PCR (RT-qPCR).**

Total RNA were extracted using Kit RNeasy mini (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed using random hexamers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Rockville, MD, USA). Duplicate samples were subjected to RT-qPCR. mRNA were quantified using primers listed below : MICA (Hs00792193\_m1) (Applied Biosystems). ABL mRNA from each sample was quantified as an endogenous control. Relative mRNA expression was calculated using the Delta-Delta-Ct method and untreated cells were used as calibrator.

### **Luciferase Assay**

HT29 and 293T cells were transfected using Lipofectamine LTX (Invitrogen, France). In all conditions Renilla luciferase (pRL-TK) and Firefly luciferase (triggered by MICA or mutated-MICA promoters in PGL3-MICA vectors) were cotransfected. Firefly luciferase light values were divided by *Renilla* luciferase light values.

### **ELISA**

Detection of IFN- $\gamma$  was done using commercial ELISA kits (Diacclone, France). The sensitivity of the human IFN- $\gamma$  kit was 4.7 pg/mL. Detection of MICA was done using ELISA kits (Diacclone, France). The sensitivity of the human MICA ELISA kit was 123 pg/ml. All concentrations are expressed as mean  $\pm$  SEM of triplicates.

### **CD107a Degranulation assay**

NK cells were activated for 24h with IL-2 (1000 UI/ml) and then cocultured in presence of target cells for 4 hours at 10:1 E:T ratio. Degranulation of NK cells was analyzed by flow cytometry analysis of the CD107a degranulation marker as previously described (29).

## **Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay**

HT29 or 293T cells ( $5 \cdot 10^6$ ) were cross-linked with 1% formaldehyde in the presence of a protease inhibitors mixture (Complete Mini EDTA Free, Roche) for 15 min at room temperature then treated with Glycine 1 M for 5 min at room temperature. Cells were harvested and after two washing steps with ice-cold PBS, lysed in 500  $\mu$ l of Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% v/v NP40, 0.5% m/v Déoxycholate Na, 2 mM EDTA, 2 mM NaF, 1 mM Vanadate, proteases inhibitor mixture). 200 to 1000 bp DNA fragments were generated with 5x10'' sonication using Vibra Cell™ sonicator (Sonics & Materials, Newton, USA). An aliquot of 100  $\mu$ l was conserved (Total input). Chromatin was immunoprecipitated overnight at 4°C with anti-human STAT3 (Clone 79D7) or control rabbit IgG. After a 2 hours incubation with Dynabeads Protein G (Invitrogen, Paris, France), beads were washed twice with Wash Buffer 1 (0.1 % SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris, 150 mM NaCl) then submitted to another washing step with Wash Buffer 2 (0.1 % SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris, 500 mM NaCl) and finally two washing steps with TE Buffer. Beads (and the total input DNA) were subsequently incubated at 65°overnight to reverse the cross-link. Incubation with Proteinase K (Invitrogen) for 30 min at 55°C was performed and DNA samples were purified using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), collected in 200  $\mu$ l TE Buffer and then assessed by PCR.

## **Statistical analysis**

Results are expressed as the mean plus or minus the standard error of mean. Group comparisons were performed using Student's t-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### Investigation of colon cancer cell line susceptibility to NK cells

The implication of STAT3 in chronic intestinal inflammation and cancer oncogenesis prompted us to investigate the ability of different colon cancer cell lines to activate NK (30-33). For this purpose, NK were purified from peripheral blood lymphocytes of normal volunteers and incubated with colon cancer cell lines or with the NK-sensitive K562 cell line for 24 hours. IFN- $\gamma$  production was monitored by ELISA in co-culture supernatants. The lowest amount of IFN- $\gamma$  was observed in NK and HT29 co-cultures ( $879 \pm 18$  pg/ml versus  $1368 \pm 48$  pg/ml,  $1790 \pm 29$  pg/ml or  $2259 \pm 75$  pg/ml for Colo320, SW620 and K562 respectively, Figure 1A). The ability of these cell lines to induce NK cell degranulation was then studied. IL-2 activated NK cells were put in the presence of target cells for 4 hours at 10:1 E:T ratio. CD107a degranulation was lower in the presence of HT29 compared to Colo320, SW620 and K562 (13% versus 27 %, 25 % or 48 %, Figure 1B). Collectively, these results indicate that HT29 is a weak activator of NK cell functions *in vitro*.

The expression of STAT3 was then examined in cell lines used in previous experiments. We could observe a higher expression of STAT3 in HT29 compared to K562, Colo320 or SW620 (Figure 1C). Considering these results, we thought to investigate the precise role of STAT3 in the recognition of HT29 by NK.

### STAT3 knock-down improves HT29 sensitivity to NK

In order to confirm the influence of STAT3 in colorectal cancer models, we generated STAT3 deficient cell lines using a lentivirus-mediated gene transfer to deliver a specifically designed siRNA for STAT3 into HT29 and to produce a stable cell line (HT29<sup>siRNA-STAT3</sup>). Western blot

analysis confirmed a reduced expression of STAT3 in the knock-down cell line HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> (Figure 2A). Moreover, the level of phospho-STAT3 was also decreased in HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> (Figure 2B).

The next set of experiments was dedicated to assess if the presence of STAT3 influences HT29 recognition by NK.

Freshly purified NK were co-cultured for 24h with HT29, HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> and harvested supernatants were then assessed for IFN- $\gamma$  production (Figure 2C). HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> triggered a significantly increased secretion of IFN- $\gamma$  by NK compared to HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29 ( $1276 \pm 82$  pg/ml versus  $510 \pm 2$  pg/ml and  $462 \pm 38$  pg/ml). To further study STAT3 implication on NK functions, we assessed CD107a degranulation according to STAT3 expression in HT29. Direct CD107a staining was performed to reveal NK degranulation against HT29, HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> (Figure 2D). We observed an increase of CD107a expression in co-cultures realized with HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> compared to HT29<sup>siRNA-CTRL</sup>, suggesting an active degranulation of NK in the condition where STAT3 is repressed (42% versus 16% and 14% for HT29 and HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> respectively). Overall, we can hypothesize that STAT3 is implicated in HT29 altered sensitivity to NK functions.

### **STAT3 inhibition of HT29 recognition by NK involves a TGF- $\beta$ 1 independent mechanism.**

NK functions result from the integration of activating and inhibitory signaling related to different ligands recognized on target cells. Transforming growth factor beta isoform 1 (TGF- $\beta$ 1), a cytokine produced by HT-29 (34), has been previously characterized as a major inhibitory pathway limiting tumor cell recognition by NK (35). Moreover, we and others have shown that STAT3 can directly trigger TGF- $\beta$ 1 transcription (36, 37). Therefore, the

expression of TGF- $\beta$ 1 in HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> and HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> was analyzed by flow cytometry (Figure 3A). We noticed a decreased expression of TGF- $\beta$ 1 in HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> compared to HT29<sup>siRNA-CTRL</sup>. The quantification of TGF-beta1 by RT-qPCR supported previous results at the protein level (Figure 3B). Indeed, TGF- $\beta$ 1 mRNA was repressed in HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> suggesting a direct link between STAT3 activity and TGF- $\beta$ 1 expression. As a consequence, we hypothesized that STAT3 activation in HT29 results in a constitutive inhibitory signal for NK. Therefore, the presence of a STAT3-dependent TGF- $\beta$ 1 expression in HT29 led us to investigate if TGF- $\beta$ 1 signaling pathway accounted for STAT3 mediated inhibition of HT29 recognition by NK. For this purpose, freshly purified NK were co-cultured with HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> and HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> for 24h in the presence or absence of a specific pharmacological inhibitor of TGF- $\beta$ 1 receptor, SB-431542 (38). SB-431542 treatment abrogates smad2/3 phosphorylation and prevented TGF- $\beta$ 1 inhibition of IL-2 activated peripheral blood cell (PBL) (data not shown). As shown previously, we observed a significant increase in IFN- $\gamma$  production when we compared HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> to HT29<sup>siRNA-CTRL</sup>. TGF- $\beta$ 1 inhibition resulted in a weak up-regulation of NK activation. In contrast, we could observe that STAT3 neutralization mediated by siRNA improved NK recognition of HT29 even when TGF- $\beta$ 1 signaling was blocked (Figure 3C). These results suggest that TGF- $\beta$ 1 and STAT3 act independently to repress NK recognition of HT29. As NK activation is known to be the result of an integration of positive and negative signaling pathways following target cell recognition, it is plausible that in the absence of the TGF- $\beta$ 1-mediated inhibitory signaling, STAT3 specific inhibition promotes the expression of NK-activating ligand on HT29.

### **STAT3 knock-down restores NKG2DLs expression in HT29**

Raulet DH et al. demonstrated an increased tumor incidence in NKG2D<sup>-/-</sup> mice (9). As a consequence, avoidance of this specific NKG2D/NKG2DLs pathway is a hallmark of many malignancies against NK immunity (28, 39, 40). Consequently, we chose to determine whether STAT3 was implicated in NKG2D-based tumor cell recognition. To clarify this point, previous experiments were reproduced in the presence of neutralizing anti-NKG2D or IgG control antibodies. NK were pre-treated for 30 min at 37°C with blocking antibodies and then co-cultured with HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> for 24h and harvested supernatants were assessed for IFN- $\gamma$  production. As shown in Figure 4A, *left panel*, IFN- $\gamma$  production by NK in the co-culture with HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> was significantly decreased in the presence of NKG2D neutralization while not affected by control antibody. Of note, NKG2D blockade reduced CD107a degranulation of NK against HT29 (Figure 4A, *right panel*). The magnitude of this inhibition by anti-NKG2D was significantly higher in the presence of specific STAT3 siRNA (Figure 4A, *right panel*). These results strongly suggested a role for the NKG2DLs in the NK activation function conferred by STAT3 inhibition in HT29. Subsequently, expression of NKG2DLs was analyzed by flow cytometry in HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> and HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> (Figure 4B). While MICA expression was influenced by STAT3 modulation, we failed to identify any variation of neither MICB nor ULBPs in HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> and HT29<sup>siRNA-STAT3</sup>. In order to confirm this hypothesis, we performed western blotting analysis on total protein extracts from HT29, HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> and HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> to control the presence of MICA. These experiments revealed a marked increase of MICA protein in HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> (Figure 4C).

Several authors mentioned that the shedding of MICA and the release of soluble protein (sMICA) are thought to promote tumor evasion (41, 42). Consequently, we assessed the supernatants coming from HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> and HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> cultures by ELISA and did not observe a significant difference in sMICA quantified in both conditions (Supplementary

Figure 2). These results suggest that MICA cleavage and secretion in the supernatant cannot account for the enhancement of MICA expression observed upon STAT3 signaling suppression.

Thereafter, we decided to assess if the correlation between the abrogation of STAT3 signaling and enhancement in MICA expression was detectable at the transcriptional level. RT-qPCR analyses were performed on total mRNA extracts from HT29 cells treated with the STAT3 pharmacological inhibitor STA21 at different time points (Figure 4D). We detected a 9-fold increase in MICA mRNA expression in the presence of STA21. Similar results were obtained using the JAK2 specific inhibitor AG490 that predominantly represses STAT3 activity (data not shown). These results show an inverse correlation between STAT3 activity and MICA expression and prompted us to study more specifically the implication of this regulation.

### **STAT3 directly interacts with specific binding sites in MICA promoter**

In order to exert its action as a transcriptional factor, STAT3 forms a cytoplasm homodimer, translocates into the nucleus and interacts with functional transcription factor binding sites (TFBSs) in the promoter of regulated genes. We sought to investigate the presence of STAT3 TFBSs in MICA promoter to further elucidate the mechanisms governing previous observations. We used the predictive software MatInspector for TFBSs and found a significant match (5'-TTCTTTCCAGGACAGACAA-3') for a more recently discovered sequence (core nucleotide denoted in capitals: TTCCNgg) (43). Complementary analyses were realized on MICB and ULBPs promoter sequences as well. We obtained specific sequences for MICB (3'-TTCCTTTCCGGGACAGACAA-5') and ULBP2 (3'-CATCTTTCCAGGCTCTCCTT-5') promoters while no specific matches were retrieved from ULBP1 and ULBP3 promoter investigations (Supplementary Data 1). We initiated a ChIP

assay to control whether STAT3 was indeed able to bind the TFBS given by MatInspector. HT29 cells were fixed with paraformaldehyde, sonicated and total proteins were harvested. Specific immunoprecipitation with STAT3 monoclonal antibody allowed for recovery and enrichment of STAT3-bound DNA. PCR, designed to amplify the sequence comprising NKG2DLs potential TFBSs, were realized on immunoprecipitated DNA (Supplementary Data 1). An internal control for STAT3 binding was used with a PCR designed to amplify STAT3 TFBS in the IL-10 promoter (44). We noticed a signal for the MICA and MICB promoters in DNA isolated from STAT3 ChIP. Interestingly, there was no signal observed for the ULBP2 promoter analysis (Figure 5A).

To further develop our hypothesis, HT29 (Figure 5B, *left panel*) and 293T cells (Figure 5B, *right panel*) that express STAT3 were transfected with a pGL3-MICA vector containing the luciferase gene under the control of the 1 kb MICA promoter. 24h post transfection, cells were stimulated with STA21 (50  $\mu$ M) before treatment 24 hours later with OSM (100 ng/ml). Luciferase assay results are presented in figure 5C. The intensity of the rationalized luciferase signal is significantly higher in HT29 cell line treated with STA21 compared to untreated cells (1.72 vs 3.35). We observed a small but significant difference in luminescence for the 293T cell line treated with STA21 in comparison to the untreated cells.

In order to confirm STAT3-TFBS specificity in our experiments, we performed a site-directed mutagenesis to remove STAT3-TFBS in the promoter region of pGL3-MICA vector, displaying MICA promoter. After successful mutagenesis, we obtained a mutated version of pGL3-MICA (pGL3-MICAmut) that did not harbor any STAT3-TFBS (Supplementary data 2). 293T cells were transfected with the normal or mutated luciferase construct. 48h post transfection, cells were stimulated for 2 hours with OSM (100 ng/ml) at 37°C to amplify

STAT3 phosphorylation. ChIP experiments were performed subsequently. PCR, designed to specifically amplify the pGL3 vector sequence, was realized on immunoprecipitated DNA (Figure 5C). We observed a specific band in the pGL3-MICA condition, suggesting a binding of STAT3 to its target sequence on the vector. When STAT3-TFBS was mutated, there was no specific sequence amplification. These results support the specificity of the binding sequence in MICA promoter. Finally, 293T and HT29 cell lines were transfected with pGL3-MICA or pGL3-MICAmut vector. Specific mutation hampering STAT3 binding to MICA promoter increased luciferase activity both in HT29 and 293T cells. Collectively, these results suggest that STAT3 regulates MICA expression at the transcriptional level.

### **Influence of STAT3 on MICA regulation by DNA damage pathways**

DNA damage response pathway was reported to play a role in up-regulation of NKG2DLs and this molecular signaling is a possible candidate bridging cellular transformation and innate immune surveillance (16). For this purpose, the role of STAT3 in NKG2DLs induction by DNA damage response or heat shock was investigated in mesenchymal stem cells and activated lymphocytes known to express MICA (45, 46). The SV56 stroma cell line (26) was transduced with a retroviral vector containing a sequence for a modified and constitutive active form of STAT3 (STAT3C) or the empty vector (pBabe) and exposed to ionizing radiation or heat shock stress. STAT3 constitutive activation led to a down-regulation of MICA and prevented the induction of MICA following ionizing radiation or heat shock exposition (Figure 6A).

Furthermore, ATM mediated DNA damage response pathway also induces MICA expression on activated T cell lymphocytes (46). Since we and others have previously reported a STAT3 phosphorylation driven by CD28 costimulation in CD4<sup>+</sup> lymphocytes (37, 47), we next

investigated the influence of STAT3 on MICA expression following CD3/CD28 mediated activation of T lymphocytes. For this purpose, T cell lymphocytes were purified, exposed or not to different STAT3 pharmacological inhibitors and activated by CD3/CD28 during 48h. As shown in Figure 6B, pharmacological inhibition of STAT3 promoted higher level of MICA expression in T lymphocytes following CD3/CD28 stimulation (Figure 6B). These results confer to STAT3 a pivotal role in MICA regulation, both in cancer and non malignant cells.

## **Discussion**

NKG2D is an activating receptor shared by NK and T cell lymphocytes, now identified as a pivotal mechanism to prevent the emergence of cancer cells arising following DNA-damage induction or spontaneous transformation (7, 9, 16). In the present study, we investigated the role of STAT3, a transcription factor harboring both oncogenic and immunosuppressive functions (27, 37), in NKG2DLs expression regulation.

In this study, we found that specific repression of STAT3 with RNA interference promoted the recognition of HT29 by NK. We demonstrated that this mechanism involves the activating receptor NKG2D (Figure 4). We revealed an inverse correlation between STAT3 activation and expression of MICA. Finally, ChIP analyses and luciferase promoter assays have shown for the first time MICA as a target for STAT3 transcriptional regulation (Figure 5).

The role of NKG2D in NK immunosurveillance has been well documented. NKG2D is involved in the prevention of cancer initiation (9) and control of tumor progression (8). DNA damage pathway checkpoints ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) could up-regulate the expression of NKG2DLs in epithelial cells, thus alerting the immune system (16). These results established MICA/NKG2D axis as an

early mechanism of tumor suppression. The higher incidence of spontaneous cancers observed in NKG2D deficient mice confirmed the tumor suppressive role of NKG2D *in vivo* (9). Moreover, the disappearance of NKG2DLs on tumor cells derived from aggressive tumors in mice expressing wild-type NKG2D and not from tumors derived from NKG2D deficient mice highlighted the presence of NKG2DLs immunoediting.

Another mechanism was previously shown to prevent NKG2D-mediated recognition. Tumor-secreted metalloprotease-induce proteolytic shedding of MICA molecules and down-regulation of NKG2DLs expression (48). However, STAT3 modulation using siRNA or specific pharmacological inhibitors did not influence the level of soluble MICA detected in HT29 culture supernatants (Supplementary Figure 1).

Furthermore, both the induction of MICA transcription following exposition to STAT3 pharmacological inhibitors and direct binding of STAT3 on MICA promoter support a direct influence of STAT3 on the transcriptional regulation of MICA.

STAT3 has been described as a potential mediator in chronic inflammatory disorders and oncogenesis. The relationship between chronic inflammation and tumor progression has been documented through clinical trials showing that long-term use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the relative risk of developing colorectal cancer by 40–50% (17). Many studies revealed the IL-6/STAT3 signaling pathway to be critical for IBD development (49). Then, it is plausible that STAT3 could be activated at the time of epithelial cell transformation or DNA-damage exposition and binds MICA promoter to prevent its expression and promote escape to NKG2D mediated immunosurveillance.

## References

1. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 715-727.
2. Hayakawa Y, Smyth MJ. Innate immune recognition and suppression of tumors. *Adv Cancer Res* 2006; 95: 293-322.
3. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410: 1107-1111.
4. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000; 356: 1795-1799.
5. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11: 237-244.
6. Koh CY, Blazar BR, George T, et al. Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo. *Blood* 2001; 97: 3132-3137.
7. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001; 413: 165-171.
8. Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11521-11526.
9. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 2008; 28: 571-580.
10. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001; 14: 123-133.

11. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000; 1: 119-126.
12. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, et al. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 6879-6884.
13. Pende D, Cantoni C, Rivera P, et al. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1076-1086.
14. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 2002; 62: 6178-6186.
15. Groh V, Bahram S, Bauer S, et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 12445-12450.
16. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005; 436: 1186-1190.
17. Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997; 39: 1-20.
18. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 2001; 91: 854-862.
19. Langowski JL, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006; 442: 461-465.

20. Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2009; 15: 114-123.
21. Szkaradkiewicz A, Marciniak R, Chudzicka-Strugala I, et al. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009; 57: 291-294.
22. Musso A, Dentelli P, Carlino A, et al. Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: an essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 91-98.
23. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 2009; 206: 1465-1472.
24. Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 2005; 11: 1314-1321.
25. Kim DJ, Chan KS, Sano S, Digiovanni J. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. *Mol Carcinog* 2007; 46: 725-731.
26. Loeuillet C, Bernard G, Rémy-Martin J, Saas P, Hervé P, Douay L, Chalmers D. Distinct hematopoietic support by two human stromal cell lines. *Exp Hematol* 2001; 29:736-745.
27. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Dvegan G, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98: 295-303.
28. Yadav D, Ngolab J, Lim RS, Krishnamurthy S, Bui JD. Cutting edge: down-regulation of MHC class I-related chain A on tumor cells by IFN-gamma-induced microRNA. *J Immunol* 2009; 182: 39-43.

29. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004; 294: 15-22.
30. Garcia R, Bowman TL, Niu G, et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001; 20: 2499-2513.
31. Dhir R, Ni Z, Lou W, et al. Stat3 activation in prostatic carcinomas. *Prostate* 2002; 51: 241-246.
32. Niu G, Bowman T, Huang M, et al. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 2002; 21: 7001-7010.
33. Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, et al. Expression of p-STAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors. *J Clin Pathol* 2005; 58:833-838.
34. Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK. A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia* 2005; 7: 509-521.
35. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 4120-4125.
36. Kinjyo I, Inoue H, Hamano S, et al. Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp Med* 2006; 203: 1021-1031.
37. Pallandre JR, Brillard E, Crehange G, et al. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol* 2007; 179: 7593-7604.

38. Hjelmeland MD, Hjelmeland AB, Sathornsumetee S, et al. SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 737-745.
39. Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, et al. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 1285-1290.
40. Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U, et al. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* 2005; 175: 720-729.
41. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003; 102: 1389-1396.
42. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 2008; 68: 6368-6376.
43. Chen X, Xu H, Yuan P, et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 2008; 133: 1106-1117.
44. Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* 2000; 165: 1612-1617.
45. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006; 107:1484-1490.
46. Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M, Piccoli M, Frati L, and Santoni A. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood* 2007; 110: 606-615.

47. Larmonier N, Janikashvili N, LaCasse CJ, et al. Imatinib mesylate inhibits CD4+ CD25+ regulatory T cell activity and enhances active immunotherapy against BCR-ABL- tumors. *J Immunol* 2008; 181: 6955-6963.
48. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419: 734-738.
49. Rose-John S, Mitsuyama K, Matsumoto S, Thaiss WM, Scheller J. Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 2095-2103.

## Figure legends

**Figure 1: Investigation of colon cancer cell line susceptibility to NK cells.** A. IFN- $\gamma$  concentration assessed by ELISA of freshly purified NK cells co-cultured with tumor cell lines for 24h at E:T ratio (10:1) (representative experiment of n=4). B. Flow cytometry analysis of CD107a expression on IL-2 activated NK cells co-cultured for 4 hours with candidate tumor cells at E:T ratio (10:1) (representative blot of n=3). C. Western blot analysis for STAT3 on whole cell extracts.  $\beta$ -actin was used as a control of protein loading (20  $\mu$ g per lane) (representative experiment of n=3). Bars, SD.

**Figure 2: STAT3 knock-down restores NK cell activation by HT29.** A. Western blot analysis for STAT3 on whole cell extracts from HT29, HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup>.  $\beta$ -actin was used as a control of protein loading (20  $\mu$ g per lane) (representative experiment of n=3). B. Flow Cytometry analysis of STAT3 and phospho-STAT3 expression by HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup>. Grey and white histograms represent isotype or STAT3 staining respectively. C. IFN- $\gamma$  concentration assessed by ELISA of freshly purified NK cells co-cultured with HT29, HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> for 24h in DMEM medium at E:T ratio (10:1). D. Flow Cytometry Analysis of CD107a expression on IL-2 activated NK co-cultured for 4 hours with HT29, HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> at E:T ratio (10:1) (representative blot of n=5). Bars, SD. \*p< 0.05.

**Figure 3: STAT3 inhibition of HT29 recognition by NK does not involve TGF- $\beta$ 1.** Flow Cytometry analysis of TGF- $\beta$ 1 expression by HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup>. Here we show isotype (grey) vs. specific staining (black). B. RT-qPCR analysis of total mRNA extracts from HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup>. Raw data were analyzed with the  $\Delta\Delta$ Ct method and results are shown as relative expression to the control HT29<sup>siRNA-CTRL</sup>

(representative experiment of n=2). B. Freshly purified NK were co-cultured for 24h with HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> in the presence or absence of the TGF- $\beta$ 1 receptor inhibitor: SB-431542 (10  $\mu$ M) at E:T ratio (10:1). Supernatants were harvested and IFN- $\gamma$  concentration was assessed by ELISA (representative experiment of n=3). Bars, SD. \*p< 0.05.

**Figure 4: STAT3 knock-down restores NKG2D ligands expression in HT29.** A. Freshly purified NK cells were co-cultured for 24h with HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> in the presence or absence of either a IgG or a NKG2D blocking antibody (20  $\mu$ g/ml for each condition). at E:T ratio (10:1). After 24 hours of co-cultures supernatants were harvested and IFN- $\gamma$  concentration was assessed by ELISA (representative experiment of n=2). B. Flow cytometry analysis of CD107a expression on IL-2 activated NK after co-cultures with HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup> (E:T ratio=10:1) for 4 hours in the presence or absence of a IgG or a NKG2D blocking antibody (representative experiment of n=3). C. Flow cytometry analysis of MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 and ULBP3 on HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup>. Here we show isotype (grey) versus specific staining (white). D. Western blot analysis for STAT3 and MICA on whole cell extracts from HT29, HT29<sup>siRNA-CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA-STAT3</sup>.  $\beta$ -actin was used as a control of protein loading (20  $\mu$ g per lane) (representative experiment of n=3). E. HT29 cells were treated with the STAT3 pharmacological inhibitor STA21 (30  $\mu$ M) for 0, 24 and 48h. mRNA was extracted and MICA expression was assessed by RT-qPCR. Bars, SD. \*p< 0.05.

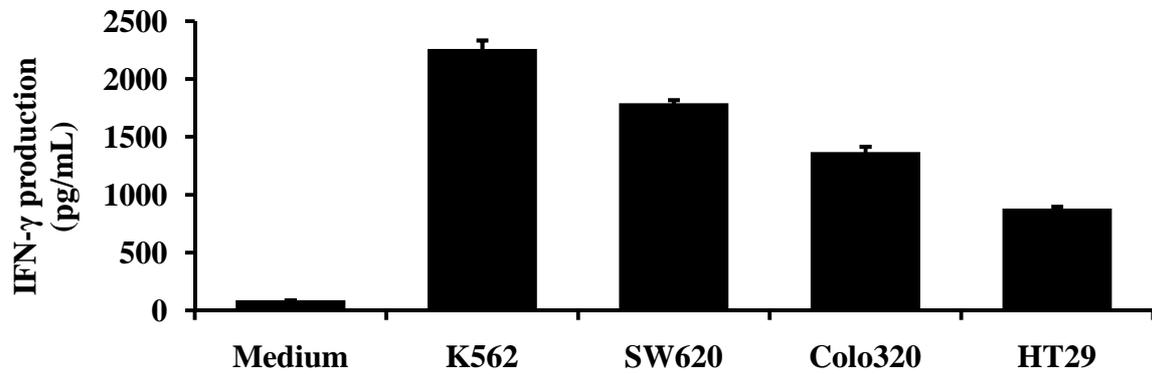
**Figure 5: STAT3 directly interact with specific binding sites in MICA promoter.** A. PCR analysis was performed on DNA retrieved from specific STAT3 ChIP experiments. Potential

site sequence is indicated along with the PCR results (representative of n=3) B. Luciferase MICA promoter assay. HT29 (right panel) and 293T (left panel) were transiently transfected with pGL3-MICA vector. After 24h, cells were treated or not with STA21 at 30  $\mu$ M. Results are presented as a ratio between the *firefly luciferase* activity and the *renilla luciferase* activity (Ren/Luc) for each conditions (n=2). C. 293T cells were transiently transfected with either the pGL3-MICA or the pGL3-MICAmut vector. After 48h, cells were treated with OSM (100 ng/ml) for 2h. After the incubation cells were fixed and a ChIP experiment was realized as previously described. PCR analysis were performed on DNA retrieved from specific STAT3 ChIP experiments (representative experiment of n=2). D. 293T and HT29 were transiently transfected with pGL3-MICA or pGL3-MICAmut. After 48h, luciferase activity was quantified using the manufacturer's protocol. Results are presented as a ratio between the *firefly luciferase* activity and the *renilla luciferase* activity (Ren/Luc) for each conditions (n=2).

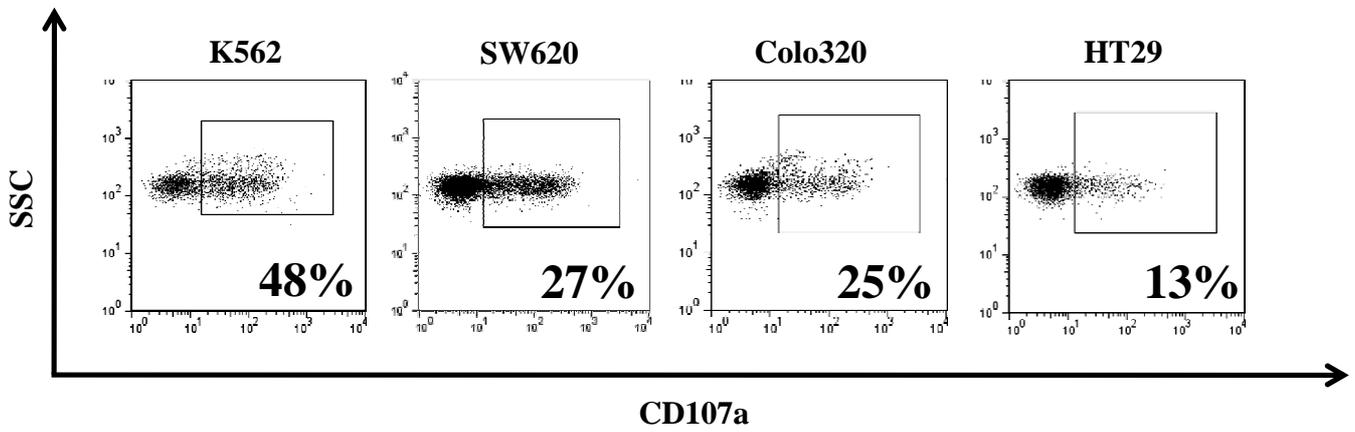
**Figure 6: STAT3 influences MICA expression in non malignant cells.** A. Stroma cell lines SV56<sup>pBabe</sup> and SV56<sup>STAT3C</sup> were stimulated with either ionizing irradiation (25 Gy) or heat shock (45°C for 1h). 16h after treatment, MICA expression was assessed by flow cytometry analysis (Representative of n=3). B. PBL isolated from healthy donor were stimulated for 48h with CD3/CD28 beads at a bead/T cell ratio of 1:1 in the presence or absence of STA21 (30  $\mu$ M) or AG490 (50  $\mu$ M). MICA expression was assessed by flow cytometry analysis (n=3).

Bedel R. et al. Figure 1

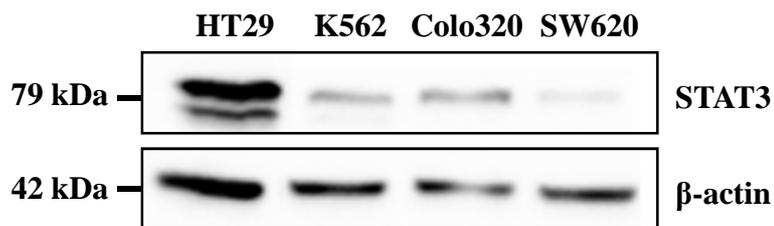
A.



B.

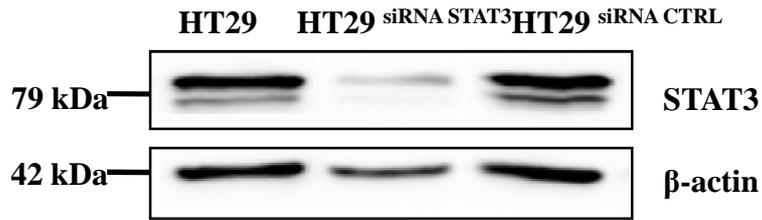


C.

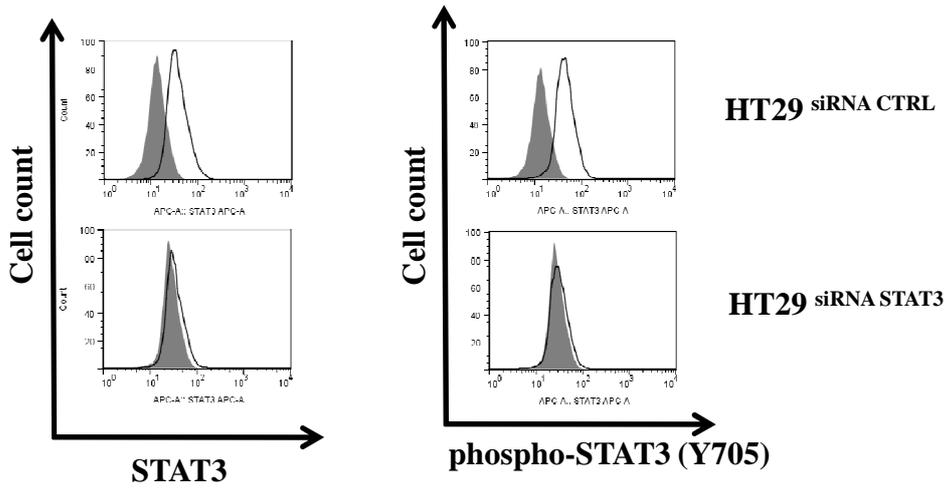


Bedel R. et al. Figure 2

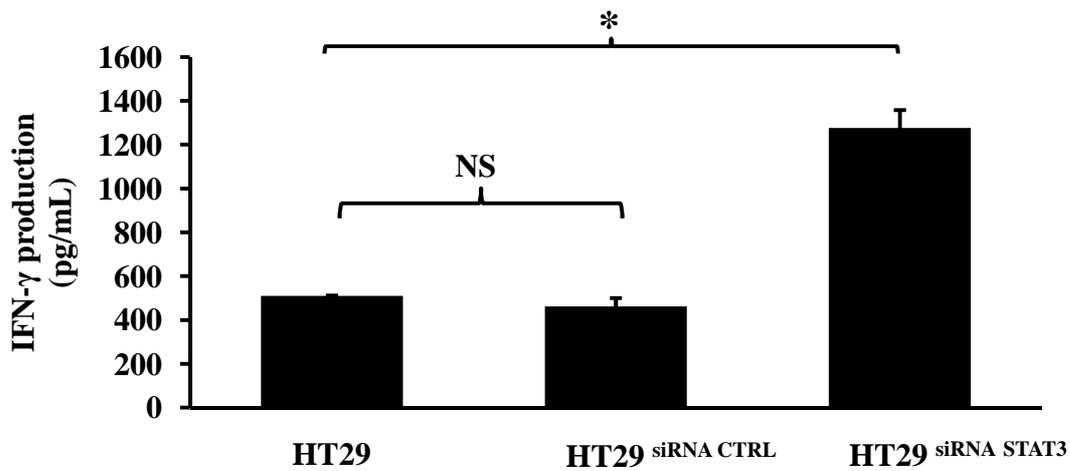
A.



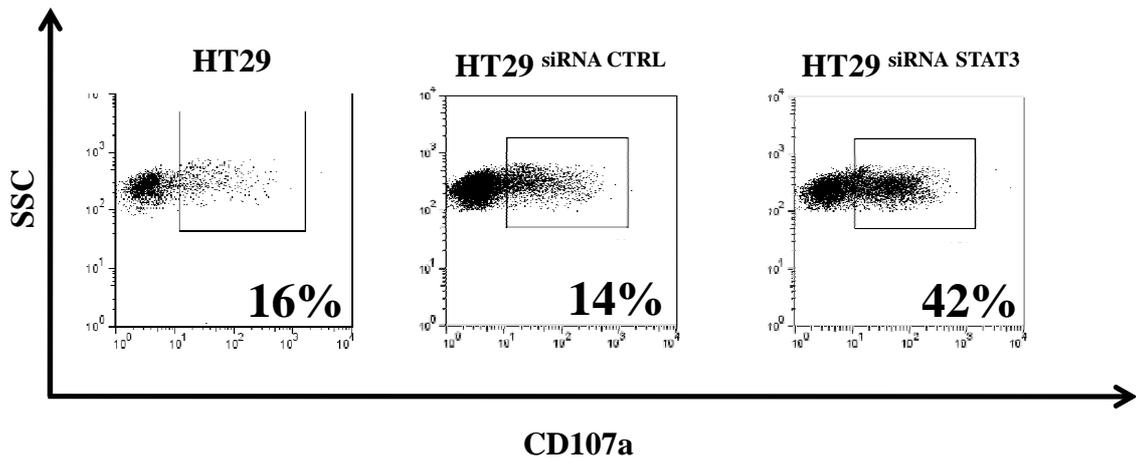
B.



C.

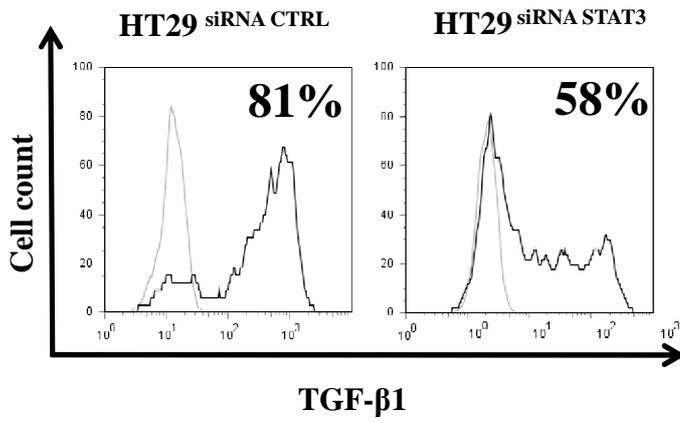


D.

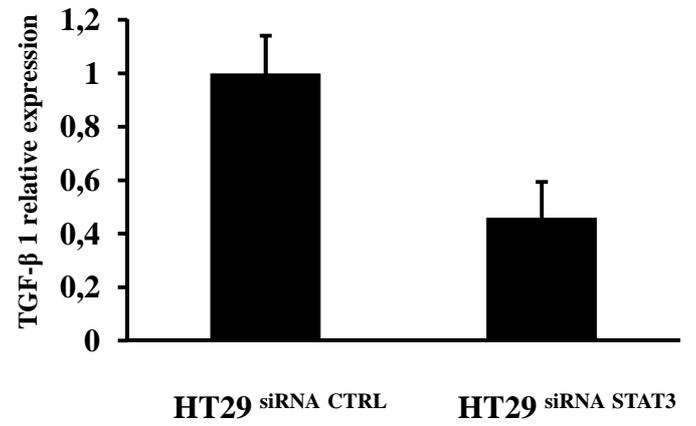


Bedel R. et al. Figure 3

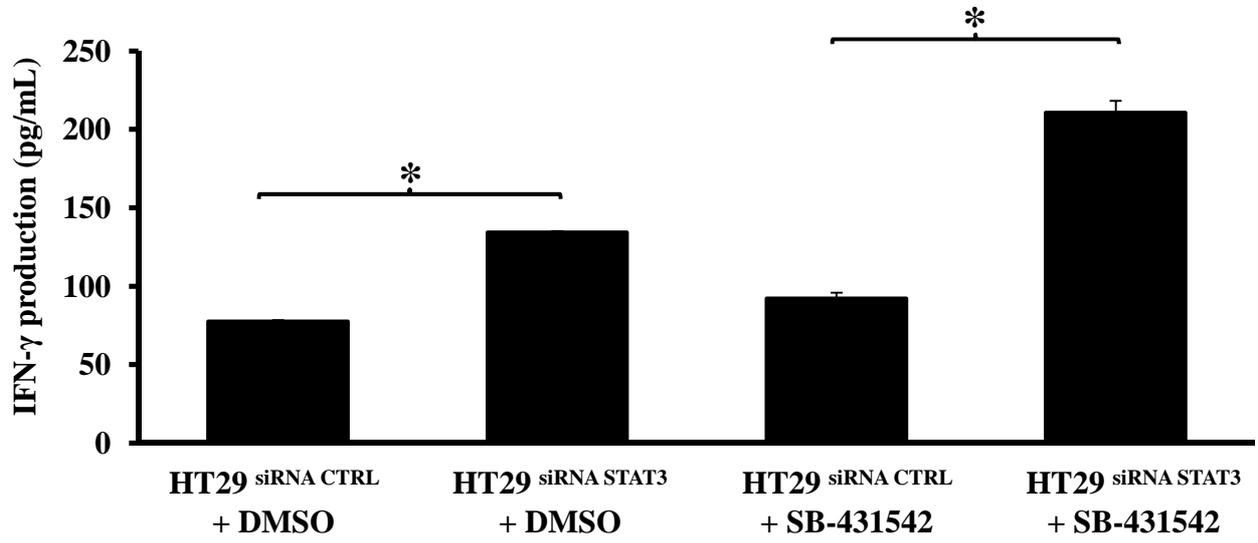
A.



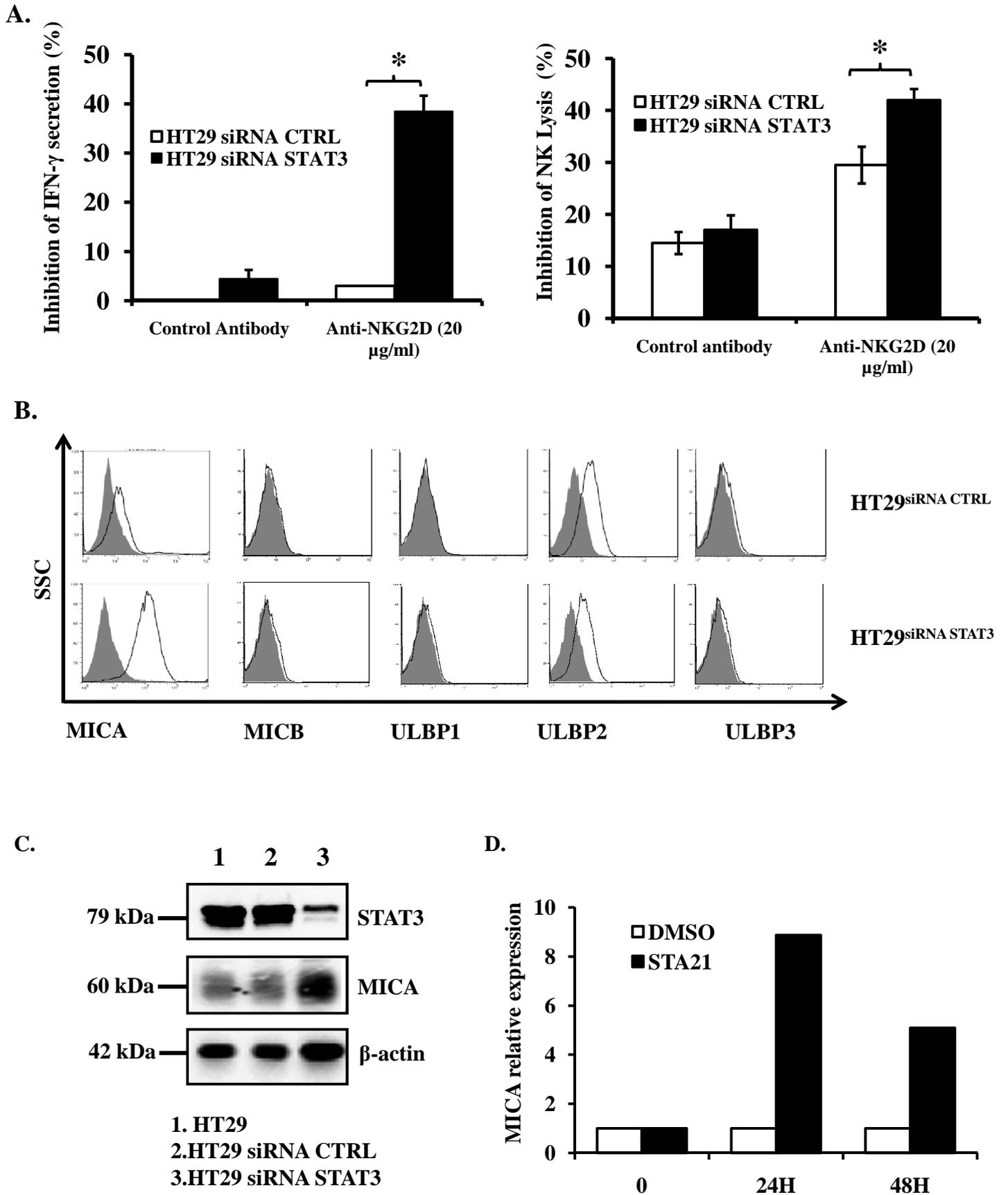
B.



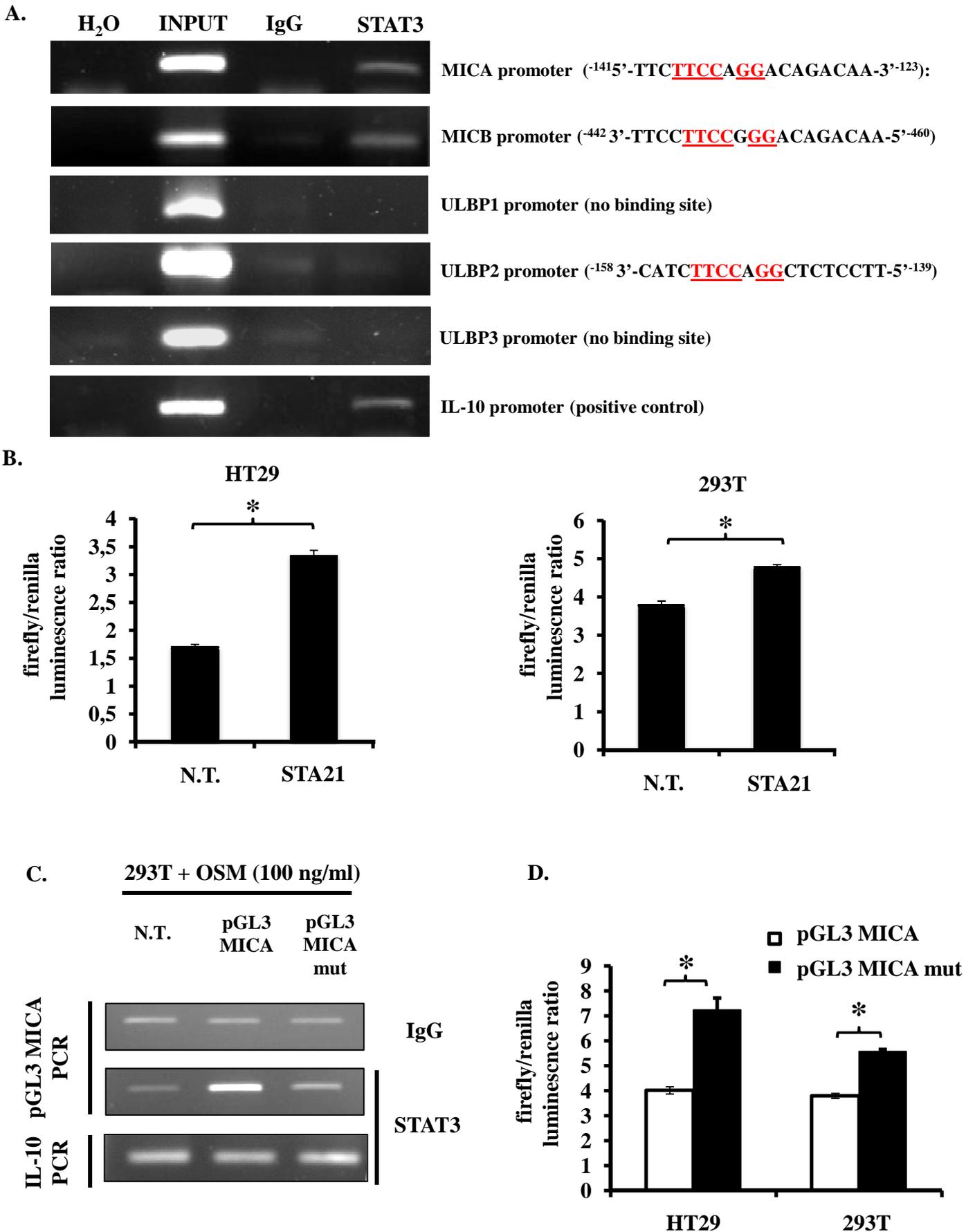
C.



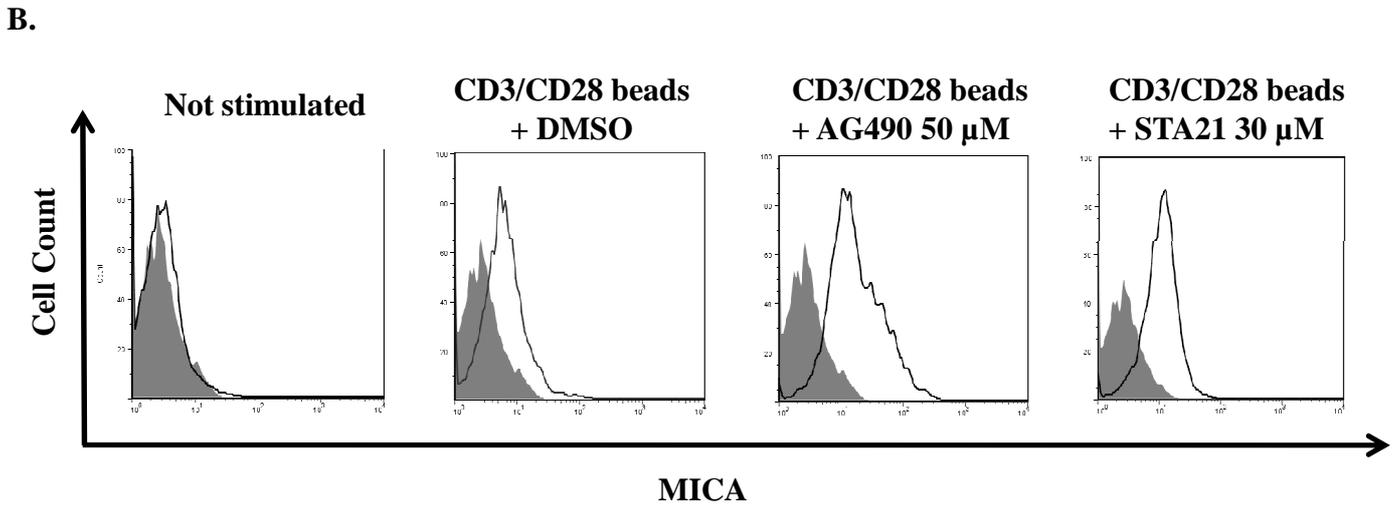
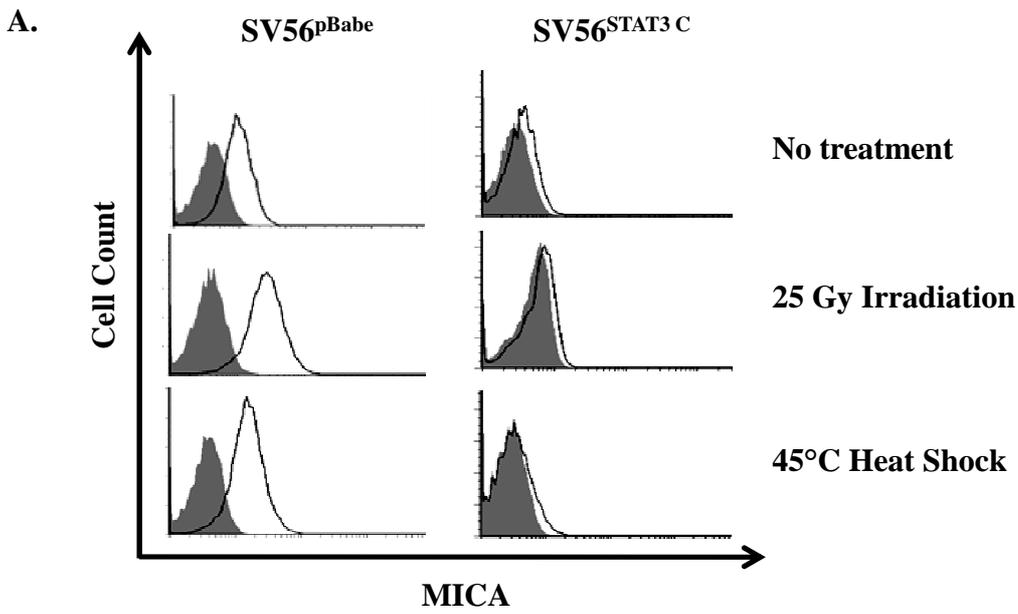
Bedel R. et al. Figure 4

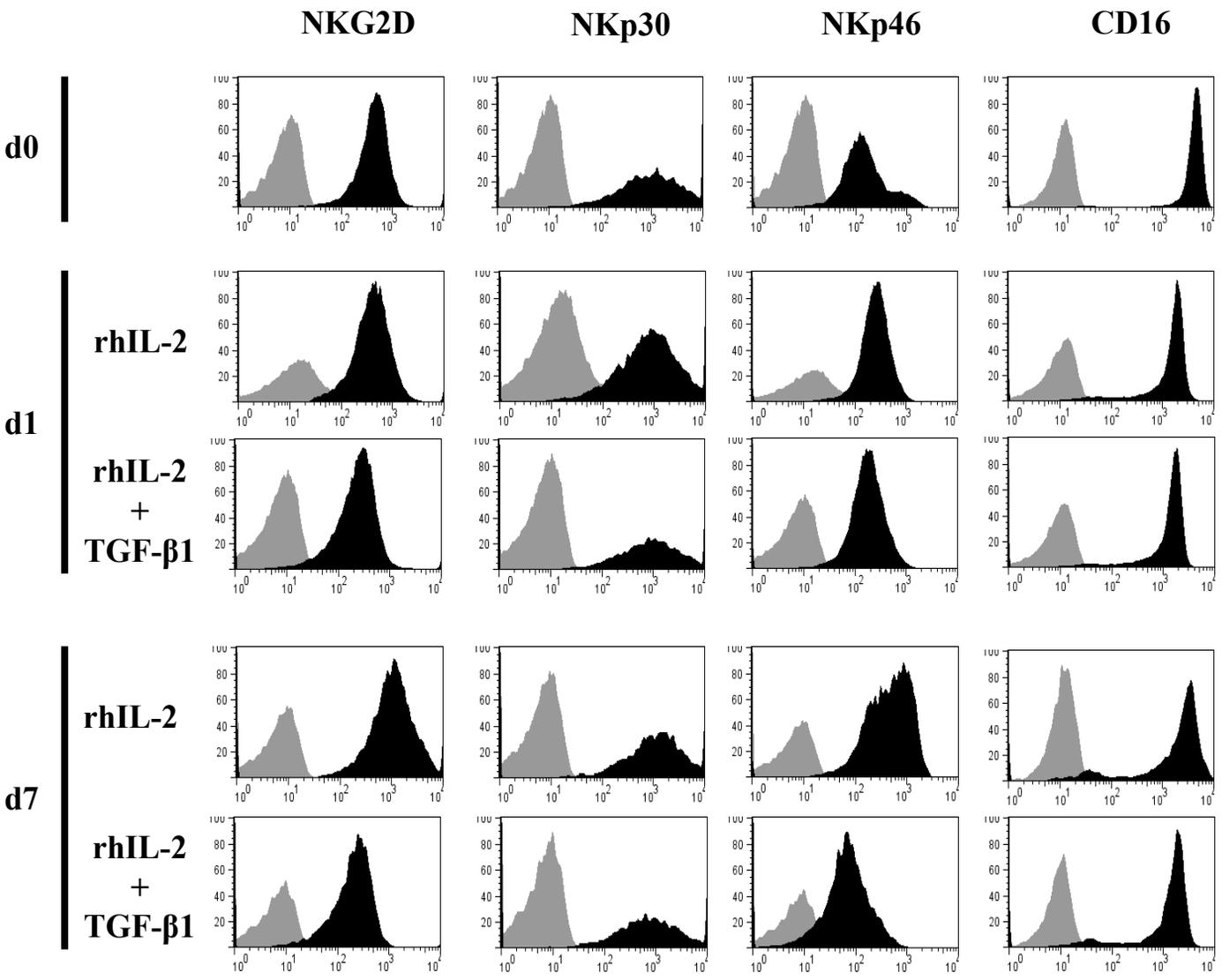


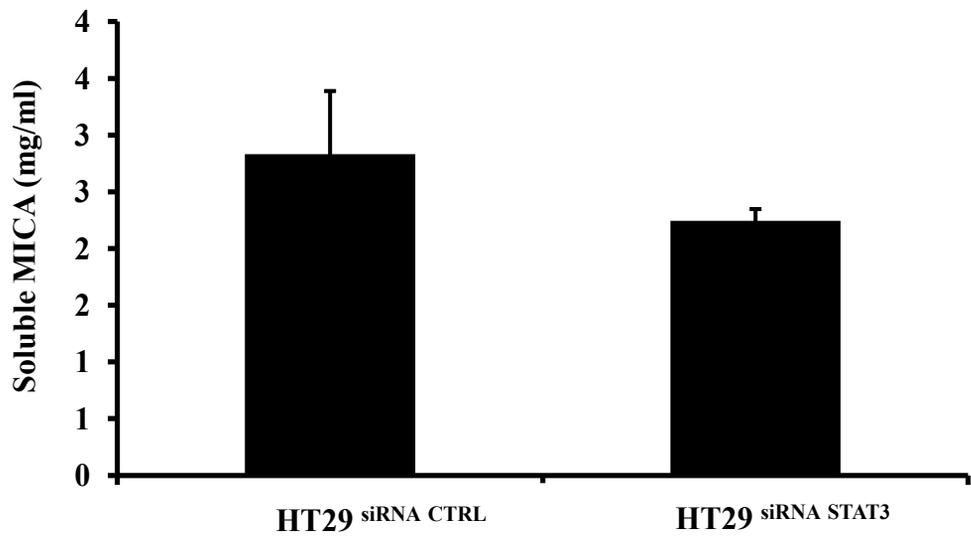
Bedel R. et al. Figure 5



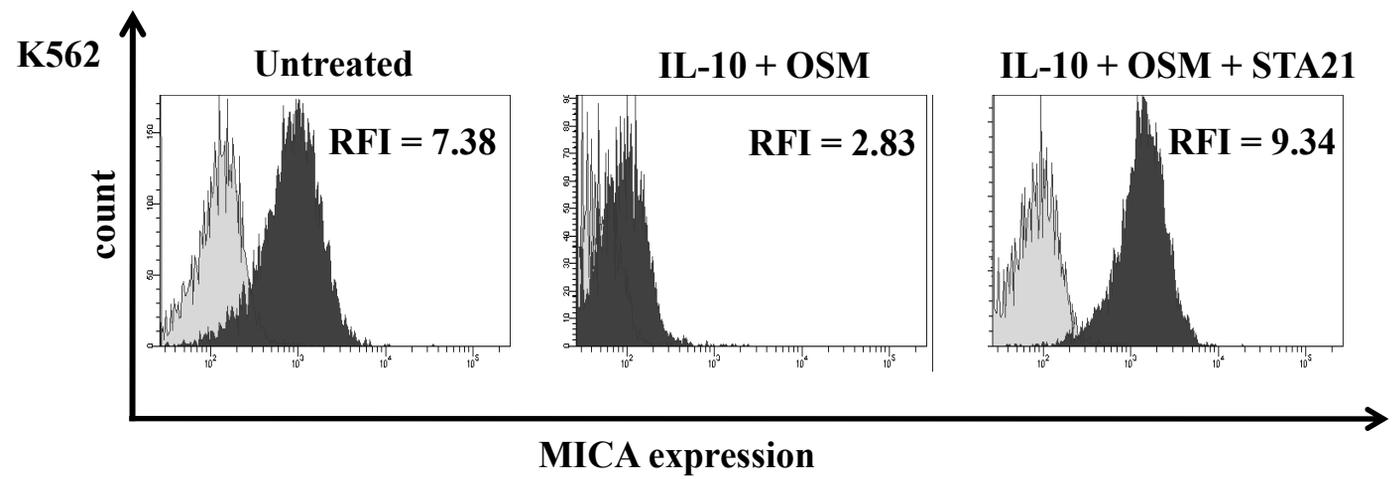
Bedel R. et al. Figure 6



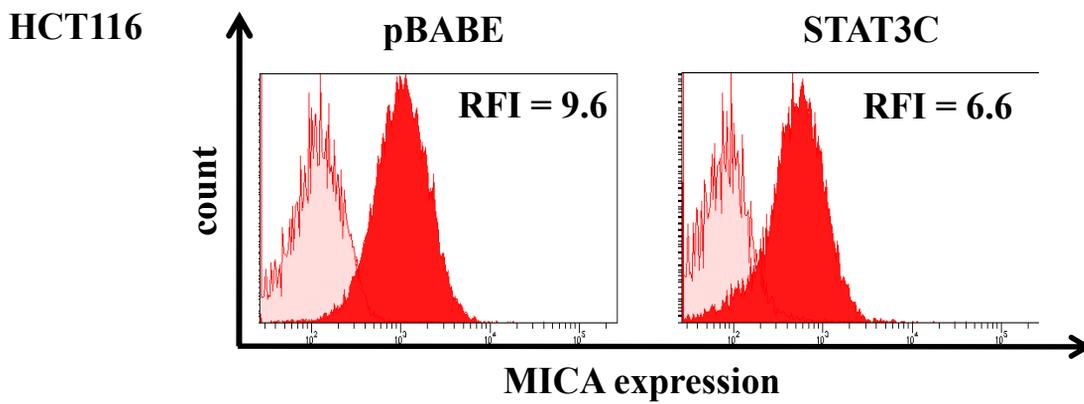




A.



B.



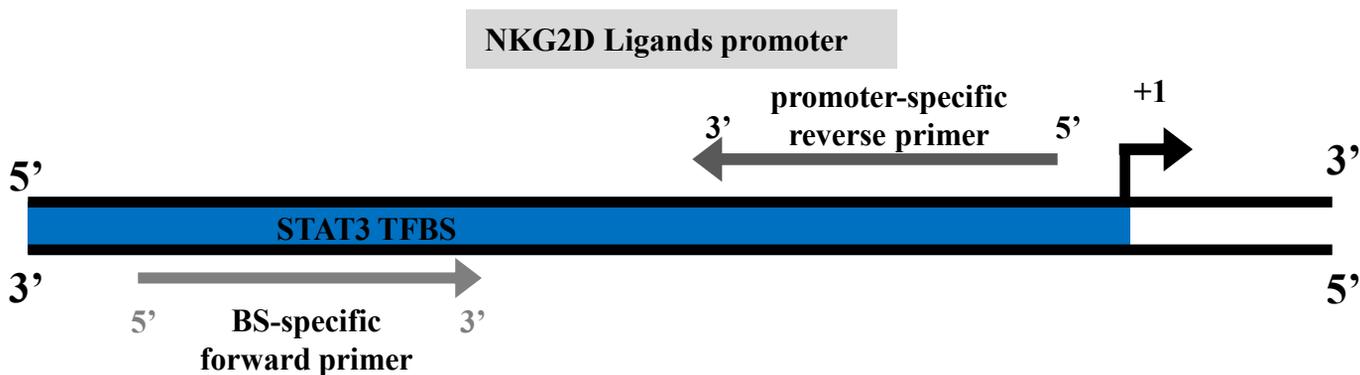
### Study of STAT3 Specific Binding sites

STAT3 potential binding sites on NKG2DL promoters were evaluated using MatInspector Software, ([http://www.genomatix.de/online\\_help/help\\_matinspector/matinspector\\_help.html](http://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html)).

MatInspector retrieved potential transcriptional binding site on NKG2DLs promoter. Using the data obtained on promoter sequence primers were designed to produce a 100 bp amplicon. The forward primer of each pair is specific to the STAT3 potential binding site and the reverse primer is specific of the NKG2DL promoter in order to avoid any cross-reactivity (cf schema). Position on the promoter is indicated for each binding site, +1 corresponding to the start codon. Here are the potential sequences found by MatInspector: MICA promoter (<sup>-141</sup>5'-TTCT**TTCCAGG**ACAGACAA-3'<sup>-123</sup>), MICB promoter (<sup>-442</sup>3'-TTCCT**TTCCGGG**ACAGACAA-5'<sup>-460</sup>), ULBP1 promoter (negative control, no site found)

ULBP2 promoter (<sup>-158</sup>3'-CATCT**TTCCAGG**CTCTCCTT-5'<sup>-139</sup>), ULBP3 promoter (negative control, no site found), As a positive control, primers specific for the binding site to IL-10 promoter were used {Kasprzycka, 2006 #64}.

	STAT3 binding site specific forward primer	Promoter specific reverse primer
<b>MICA</b>	5'-TTCCTTCCAGGACAGACAAC-3'	5'-GGTGCTTCTGAGAGGCAGAG-
<b>MICB</b>	5'-ATTGGGAGAAAAACCACGCG-3',	5'-GCGCGGGCTTACCAAGCCC--3'
<b>ULBP1</b>	5'-TATGCAAGTTTCTTCATCTT-	5'--CTGTGCCCGGACCGACT-
<b>ULBP2</b>	5'-CATCTTCCAGGCTCTCCTT-,	5'-AGGTAGGTGCTTGAGTGG-
<b>ULBP3</b>	5'ATCCCCGAACTACCGGCCCG-	5'-CAGATGTTACCGTCGCCGG-



**Non mutated pGL3 MICA vector (pGL3 MICA)**

**+756 bp**

GCCTGCCCTCCCGGCATCGCGACCACCCATCCCCGCGCCCCACCCCGAGGAGCGCGGG  
CCTCACCAAGCCCCTTTCGCCGGCCGCCCCATTAAACCGGCTCTCACTGGCTTGTTCCTT  
**CCAGG**ACAGACAACGCGTGGCTATTCTCCCAACACACTCCCTCAACCGCGCACAGCGTT  
ACTGGCAATGAGACCAGTGACCAGATTTGCAGACCTGTTTCCAGATCTCAGCCACCTCTG  
CCTCTCAGAAGCACCTGCCGCAGTAGAACCGC

**+480 bp**

**mutated pGL3 MICA vector (pGL3 MICA-mut)**

**+756 bp**

GCCTGCCCTCCCGGCATCGCGACCACCCATCCCCGCGCCCCACCCCGAGGAGCGCGGG  
CCTCACCAAGCCCCTTTCGCCGGCCGCCCCATTAAACCGGCTCTCACTGGCTTGTTC**CCG**  
**ATAGG**ACAGACAACGCGTGGCTATTCTCCCAACACACTCCCTCAACCGCGCACAGCGTT  
ACTGGCAATGAGACCAGTGACCAGATTTGCAGACCTGTTTCCAGATCTCAGCCACCTCTG  
CCTCTCAGAAGCACCTGCCGCAGTAGAACCGC

**+480 bp**

**Supplementary Figure 1: Short period TGF- $\beta$ 1 stimulation does not affect NKG2D expression on NK cells.** Freshly purified NK cells from healthy volunteer donor were cultured in RPMI medium for the indicated period in the presence of rhIL-2 (100 UI/ml) in the presence or absence of TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). FACS analysis of NKG2D, NKp30, NKp46 and CD16 expression on NK cells were realised subsequently at the indicated time (n=2).

**Supplementary Figure 2: sMICA production is unaffected by STAT3 repression.** HT29<sup>siRNA CTRL</sup> or HT29<sup>siRNA STAT3</sup> cell lines were cultured for 24h in normal conditions and supernatants were harvested. sMICA presence in the supernatant was assessed by ELISA (n=2).

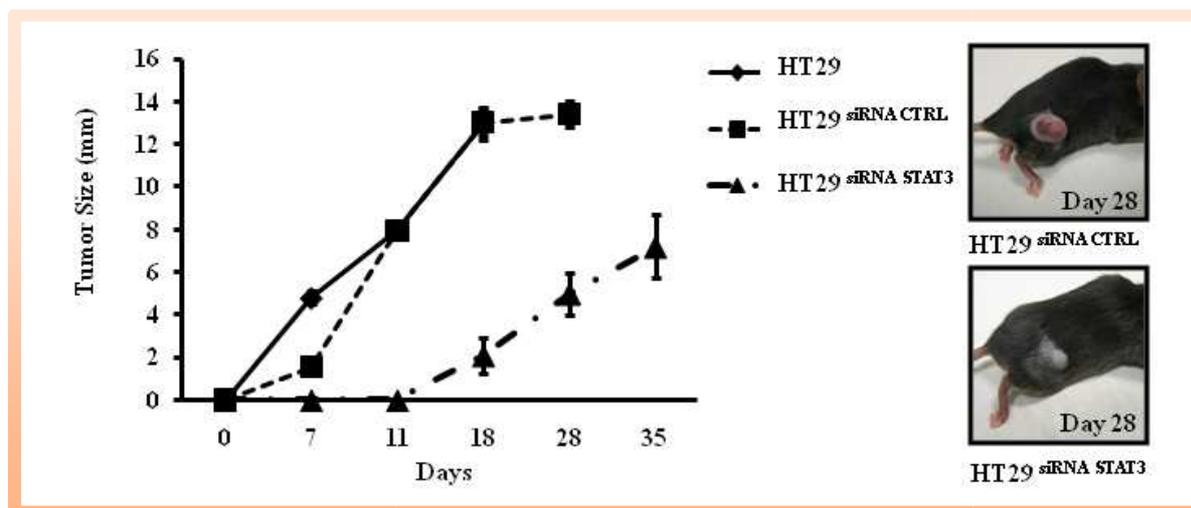
**Supplementary Figure 3: STAT3 inhibition can affect MICA expression in other tumor cell lines.** A K562 cell line was treated or not for 30 min with 30  $\mu$ M STA21 at 37°C and were subsequently incubated for 48h with 100 ng/ml OSM and 50 ng/ml IL-10. Flow Cytometry analysis of MICA expression is represented. Here we show isotype (grey) versus staining (black) (n=2) B. HCT116 were transiently transfected with either a control pBabe vector or a pBabe STAT3 C vector. 48h post-transfection, MICA expression is assessed with Flow Cytometry Analysis. RFI represents the ratio between the MFI of the staining and the MFI of control antibody.

---

## 2.2 RESULTATS DE L'ARTICLE

NKG2D est un récepteur activateur exprimé par les lymphocytes NK et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Il est maintenant reconnu comme étant un acteur majeur dans la prévention des développements cancéreux suite aux dommages de l'ADN ou par transformation spontanée (Diefenbach et al., 2001; Guerra et al., 2008). Dans ce travail, nous avons étudié le rôle de STAT3 dans la régulation d'expression des ligands de NKG2D.

Après avoir évalué le niveau d'expression de STAT3 dans différentes lignées cancéreuses, nous avons observé une forte expression de STAT3 dans la lignée de cancer colorectal HT29. Par la suite, nous avons pu produire des lignées transgéniques HT29 réprimant le facteur de transcription STAT3 en utilisant des siRNA spécifiques. La répression de STAT3 dans HT29 ralentit la progression tumorale dans un modèle de xénogreffe dans des souris C57BL/6 Rag<sup>-/-</sup> γc<sup>-/-</sup>. Cette observation nous a permis de constater une implication de STAT3 dans les processus oncogéniques de la lignée HT29 et a renforcé l'intérêt porté à cette lignée cellulaire pour notre étude (Figure 24).



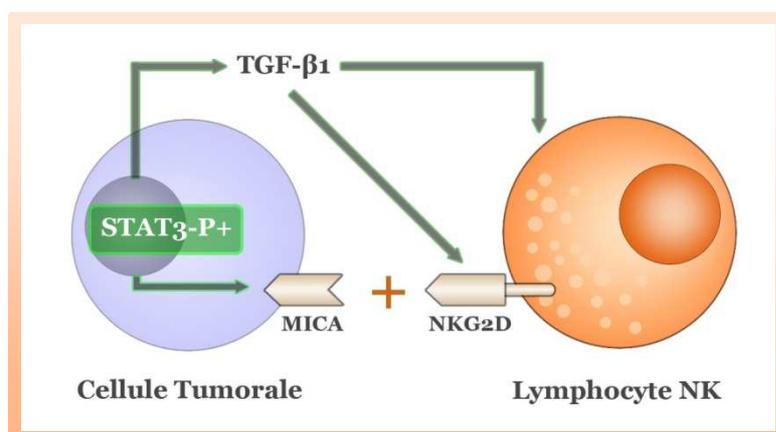
**Figure 24 - STAT3 est impliqué dans les propriétés oncogéniques de la lignée HT29.**

*Panel de gauche*,  $1.10^6$  cellules HT29, HT29<sup>siRNA CTRL</sup> et HT29<sup>siRNA STAT3</sup> sont injectées en sous-cutanée chez des souris Rag<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> et la progression tumorale est contrôlée régulièrement (n=3 souris par groupe, représentatif de 3 expériences). *Panel droite*, photos des tumeurs présent à J28 après injection des cellules tumorales.

La suite de notre étude a été d'évaluer le potentiel de la lignée HT29 à activé des lymphocytes NK fraîchement purifiés. Les co-cultures réalisées pendant 24h entre NK et HT29 ont montrés que ces cellules étaient moins capables de stimuler la production d'IFN-γ et la degranulation de granules cytotoxiques que les lignées utilisées en contrôle et exprimant de faible taux de la protéine STAT3. De manière intéressante, la répression de STAT3 dans la lignée HT29 induit une plus forte activation des cellules NK à l'encontre des cellules cibles, attribuant à STAT3 un rôle potentiel dans la faible immunogénicité de la lignée HT29.

Nous avons par la suite étudié l'implication que pourrait avoir le TGF-β1 dans l'effet activateur observé sur les cellules NK. Cette cytokine est fortement exprimée par de nombreuses lignées tumorales et sa transcription est stimulée par STAT3 dans certains modèles. Nous avons démontré que la répression de STAT3 dans notre lignée d'intérêt diminuait l'expression du TGF-β1. Pourtant, cette diminution d'expression ne peut pas expliquer le regain d'activité NK en face des cellules HT29 déficientes pour STAT3. En effet,

des expériences de co-cultures réalisées en présence d'un inhibiteur du TGF- $\beta$ 1 (SB-431542) ont été réalisées. Alors qu'il est observé une différence significative entre les productions d'IFN- $\gamma$  conditions HT29<sup>siRNA CTRL</sup> et HT29<sup>siRNA STAT3</sup>, il existe également une différence de production d'IFN- $\gamma$  dans les conditions traitées par le SB-431542. Ce résultat suggère que le TGF- $\beta$ 1 n'est pas impliqué directement dans la régulation de l'activation NK associée à STAT3 dans la lignée HT29. Néanmoins, ces résultats mettent un avant l'intéressante synergie entre les inhibiteurs du TGF- $\beta$ 1 et l'inhibition de STAT3 (Figure 25). En effet, le TGF- $\beta$ 1 agit directement sur l'activité proliférative NK et l'expression du NKG2D à la surface des cellules NK (Castriconi et al., 2003). La répression de STAT3 dans les lignées tumorales favorise à court terme (24h) l'expression de MICA à la membrane en prévenant l'inhibition instaurée par le facteur de transcription. Dans un second temps (à partir de J5), la sécrétion du TGF- $\beta$ 1 est réduite par la diminution de l'activité STAT3. Le TGF- $\beta$ 1 n'agit donc plus sur la prolifération des lymphocytes NK ni sur l'expression de NKG2D. On observe alors à terme une synergie entre l'inhibition du TGF- $\beta$ 1 et de STAT3 qui accroît significativement les fonctions cytotoxiques des cellules NK à l'encontre des cibles tumorales (Figure 25).



**Figure 25 - STAT3 et TGF- $\beta$ 1 agissent en synergie pour inhiber les fonctions**

NK. La répression de STAT3 dans la cellule tumorale prévient son activité transcriptionnelle sur le gène du TGF- $\beta$ 1. En outre, l'inhibition de STAT3 induit l'expression de MICA à la surface de la cellule tumorale. Par ailleurs, à plus long terme, la perte de de l'activité TGF- $\beta$ 1 permet une meilleure prolifération des lymphocytes NK et stimule l'expression de NKG2D sur les cellules NK

Par la suite, nous avons évalué l'aptitude de STAT3 à réguler l'activation NK par la voie NKG2D. Des expériences de co-cultures entre les différentes lignées HT29 et les cellules NK en présence d'anticorps bloquant NKG2D ont montré une diminution significative de la production d'IFN- $\gamma$  et de l'expression du CD107a en comparaison des conditions contrôles. Ces données semblent attribuer un rôle à STAT3 dans la régulation de la voie NKG2D. L'étude de l'expression des NKG2DL en cytométrie de flux a montré par la suite une forte induction de l'expression de MICA chez les cellules HT29<sup>siRNA STAT3</sup> alors que les cellules HT29<sup>siRNA CTRL</sup> ne l'expriment pas naturellement. Ces données furent ensuite confirmées par des analyses en RT-qPCR et par Western blotting.

Enfin, nous avons poursuivi notre travail en caractérisant l'interaction moléculaire entre STAT3 et les NKG2DL. Nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation de chromatine avec un anticorps monoclonal dirigé contre STAT3. Nous avons pu extraire l'ADN associé à STAT3 et confirmer la fixation de STAT3 au promoteur de MICA, associant le FT à une régulation directe du NKG2DL MICA. En complément de cette étude, des analyses de promoteur par un test en luciférase ont été réalisées. L'inhibition de STAT3 dans la lignée 293T STAT3 C a permis d'induire un signal luminescent plus intense par rapport à la condition contrôle sans traitement. Ce résultat nous a permis de démontrer une interaction directe entre STAT3 et le promoteur de MICA.

En complément des travaux décrit précédemment, nous avons souhaités évalués l'implication de STAT3 dans l'induction de MICA observé au cours de stress cellulaires endommageant l'ADN (choc thermique, irradiation  $\gamma$ ). L'induction d'un choc thermique (42,5°C) ou l'irradiation de cellules à 45 Gy ont permis d'augmenter l'expression de MICA dans la lignée de cellules souches mésenchymateuses SV56. Cet effet n'était pas retrouvé lorsque les cellules étaient transfectées par le vecteur d'expression de STAT3 C, une forme

constitutivement active. L'activité inhibitrice de STAT3 sur l'expression de MICA semble s'opposer à l'expression de MICA après l'induction de dommages au niveau de l'ADN.

Collectivement, ce travail dévoile un nouveau mécanisme d'immunoévasion associé au facteur de transcription STAT3. L'activité de STAT3 dans les cellules en cours de transformation ou les cellules tumorales pourrait prévenir l'expression de ligands de NKG2D comme MICA. Cette répression préviendrait la reconnaissance du danger potentiel porté par la cellule en transformation lorsque les cellules NK la rencontrent. Notre travail présente STAT3 comme un médiateur de l'immunoévasion par son interaction avec la voie des NKG2DL.



# *Discussion*



De nombreuses études ont caractérisé le rôle de notre système immunitaire inné et adaptatif dans l'immunosurveillance des cancers. Pourtant le terme « immunosurveillance » n'est plus suffisant pour expliquer les interactions complexes qui surviennent entre une tumeur en développement et les cellules immunitaires. Initialement, le concept d'immunosurveillance suggérait que seul le système immunitaire adaptatif pouvait reconnaître les cellules en cours de transformation et protéger l'hôte contre ces pathologies malignes. Par contraste, il est maintenant admis que ce processus fait intervenir les deux compartiments de l'immunité. Malgré les nombreux mécanismes anti-tumoraux employés par notre organisme pour prévenir le développement cancéreux, il est observé l'émergence et l'évolution de tumeurs chez les hôtes immunocompétents.

L'hypothèse de travail de notre étude était qu'il existe des processus oncogéniques capable de stimuler l'évasion au système immunitaire et promouvoir le développement tumoral. Nous avons choisi STAT3 comme un candidat potentiel pour éprouver cette hypothèse. STAT3 possède de nombreuses caractéristiques intéressantes pour notre étude. Premièrement, c'est un oncogène affectant de nombreuses voies de signalisation critiques pour l'expansion des cellules tumorales (prévention de l'apoptose, induction de la prolifération). Deuxièmement, STAT3 est capable de stimuler la production de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- $\beta$  et l'IL-10. Troisièmement, il est critique pour la modulation et la polarisation des réponses immunitaires. Tous ces éléments font de STAT3 une molécule de choix dans notre étude.

Par ailleurs, notre étude s'est focalisée sur l'immunité innée. STAT3 est capable d'affecter le signal du TGF- $\beta$ , une cytokine fortement immunosuppressive pour les cellules du compartiment inné. Son influence sur les lymphocytes NK a donc été évaluée.

## 1 L'ÉCHAPPEMENT AU SYSTÈME IMMUNITAIRE

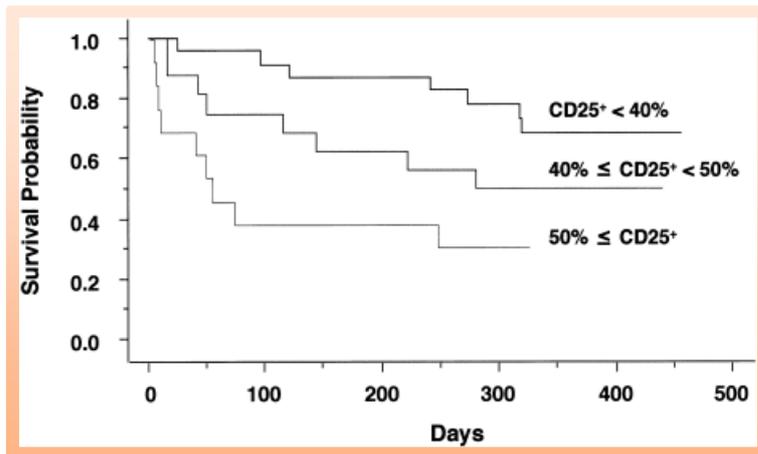
Il a été montré que le système immunitaire disposait de nombreux éléments effecteurs pour éradiquer le développement tumoral *de novo* chez l'individu sain. Les voies cellulaires (lymphocytes NK et lymphocytes T) et cytokiniques (IFN- $\gamma$ ) sont alors capable de contenir la progression tumorale et de maintenir l'intégrité de l'organisme. Pourtant, un grand nombre de patients atteints de cancer possèdent un système immunitaire compétent. Par conséquent, il doit exister des mécanismes biologiques permettant à la tumeur de se soustraire à la surveillance de système immunitaire. Si les données de la littérature sont parfois évasives sur le sujet, des observations issues des études cliniques tendent à confirmer la mise en place de mécanismes favorisant l'échappement à l'immunité. Si l'évaluation de l'évasion à l'immunité anti-tumorale et de son évasion reste complexe, certaines données cliniques exposent la perte d'éléments activateurs clés du système immunitaire comme un mauvais pronostic pour le patient.

---

### 1.1 CONSTATATIONS CLINIQUES

Les lymphocytes T régulateurs sont des cellules décrites initialement pour leur faculté à entretenir un environnement tolérogène et contrôler les réponses T effectrices (Sakaguchi et al., 2009). En 2001, l'équipe de June et al. a pour la première fois associée les Treg à une pathologie cancéreuse. En effet, ils ont découvert que le nombre de lymphocytes T régulateurs présents dans le sang était plus importante et chez les patients atteints de cancer du poumon et de l'ovaire que les patients sains (Woo et al., 2001). En outre la proportion de Treg présents dans la tumeur était sensiblement accrue. Cette forte proportion pourrait expliquer une immunité anti-tumorale moins efficace au niveau de la tumeur. Par la suite, une étude réalisée dans les carcinomes gastriques démontra que la forte proportion de Treg au niveau de la

tumeur était corrélée à une probabilité de survie plus faible pour les patients malades, soutenant l'hypothèse d'un rôle négatif de ces cellules dans le pronostic du patient (Figure 26) (Sasada et al., 2003).



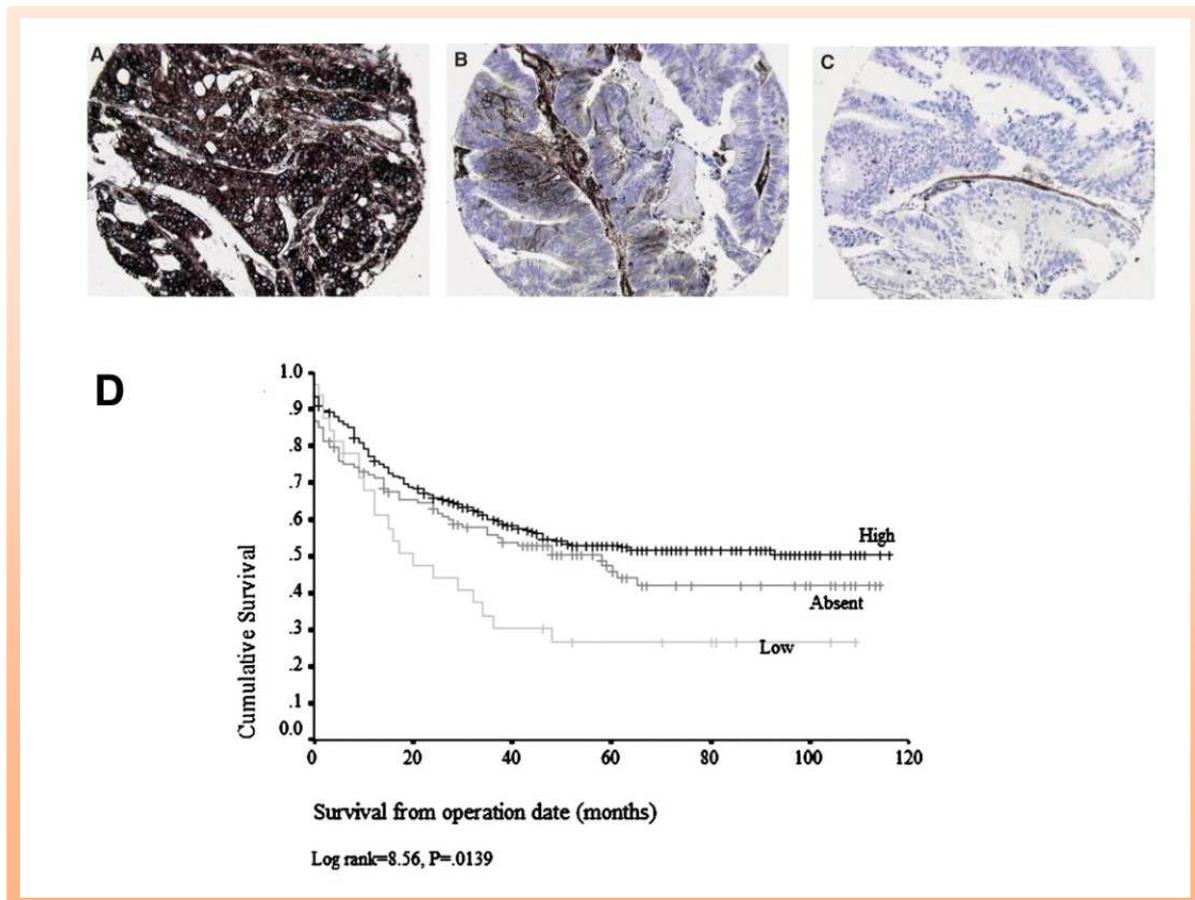
**Figure 26 – Courbe de survie de patients atteints de carcinomes gastriques en fonction de la proportion de Treg parmi les lymphocytes T totaux.**

Les proportions sont évaluées en trois niveaux : moins de 25% (n=23), entre 40 et 50% (n=17), plus de 50% (n=14) ( $P = 0.007$ ). D'après (Sasada et al., 2003).

L'équipe de Curiel et coll. a pu montrer que une grande quantité de Treg retrouvés au niveau intra-tumorale et dans l'ascite était inversement corrélée à la survie des patients atteints de carcinome ovarien (Curiel et al., 2004). Depuis lors, l'accumulation des Treg au site tumoral a aussi été démontrée dans d'autres modèles tumoraux comme le mélanome, les gliomes ou encore les cancers colorectaux (Bonertz et al., 2009; Sato et al., 2005; Sugihara et al., 2009; Viguier et al., 2004). Cette accumulation de Treg au sein de la tumeur est également associée à une augmentation de la production de TGF- $\beta$ 1. Dans les cancers du sein, la présence de Treg et la proportion de Treg intra-tumoraux apparaissent significativement augmentées chez les patients présentant une maladie au stade III (Classification TNM) par rapport aux patients en stade II (Gupta et al., 2007). La présence de Treg au niveau tumoral permettrait alors la prévention d'une réponse immunitaire efficace et leur production de TGF- $\beta$  apparait comme un élément décisif dans la répression des réponses T mais aussi des cellules NK. On conçoit alors qu'une tumeur qui progresse est une tumeur qui est parvenue, par adaptation, à se soustraire au contrôle de l'immunité anti-tumorale.

Les lymphocytes T régulateurs ne sont pas les seules sources de mauvais pronostic évaluées dans les études de cohorte. Dans une étude portant sur des patients atteints de cancer colorectaux, l'équipe de Watson N.F.S a montré que la perte du CMH I pouvait être retrouvée chez certains patients (Figure 27). Sur un total de 348 tumeurs, 45 présentaient une faible expression de CMH I (9,9%) et 62 tumeurs étaient complètement négatives pour l'expression du CMH I (13,6%). Si la perte de CMH I n'est pas corrélée avec le stade du cancer et sa progression, il est en revanche signe de mauvais pronostic pour la survie du patient. Les patients présentant une expression du CMH I diminuée ont une survie cumulée moitié moindre que les patients exprimant un taux normal du CMH I (Watson et al., 2006a). L'étude des pertes d'hétérozygotie i.e. la délétion de gènes appartenant à un des deux parents, montre fréquemment une perte sélective de l'expression de gène du CMH I (HLA-A et HLA-B) dans les cancers de la vessie, de la prostate, du colon ou encore dans les mélanomes (Browning et al., 1996; Cabrera et al., 1998; Cabrera et al., 2003; Koopman et al., 2000; Maleno et al., 2004; Romero et al., 2005; Ryschich et al., 2004). D'autre part, des mutations dans les exons 2 et 4 des gènes codant pour les molécules de HLA-A2 ou dans les exons 1 et 2 des gènes de la  $\beta_2$ -m sont observées dans 27% des cancers du col de l'utérus (Brady et al., 2000; Koopman et al., 1999). Plusieurs mécanismes semblent donc possibles pour prévenir la présence de CMH I membranaire et cela indique un processus important pour la cellule. Certaines études suggèrent que cette perte n'apparaît pas critique dans la localisation des lymphocytes T au site tumoral (Ryschich et al., 2004), permettant une mobilisation des Treg, elle joue un rôle important dans la prévention des réponses T CD8<sup>+</sup> effectrices. D'autres travaux réalisés dans les cancers colorectaux montrent que l'infiltrat de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est inversement proportionnel au taux d'expression du CMH I par la cellule tumorale. La perte de réponse à l'immunité adaptative étant alors associée à une survie plus faible (Menon et al., 2004). La

perte du CMH I est un élément pertinent pour évaluer l'échappement immunitaire dans la progression tumorale.



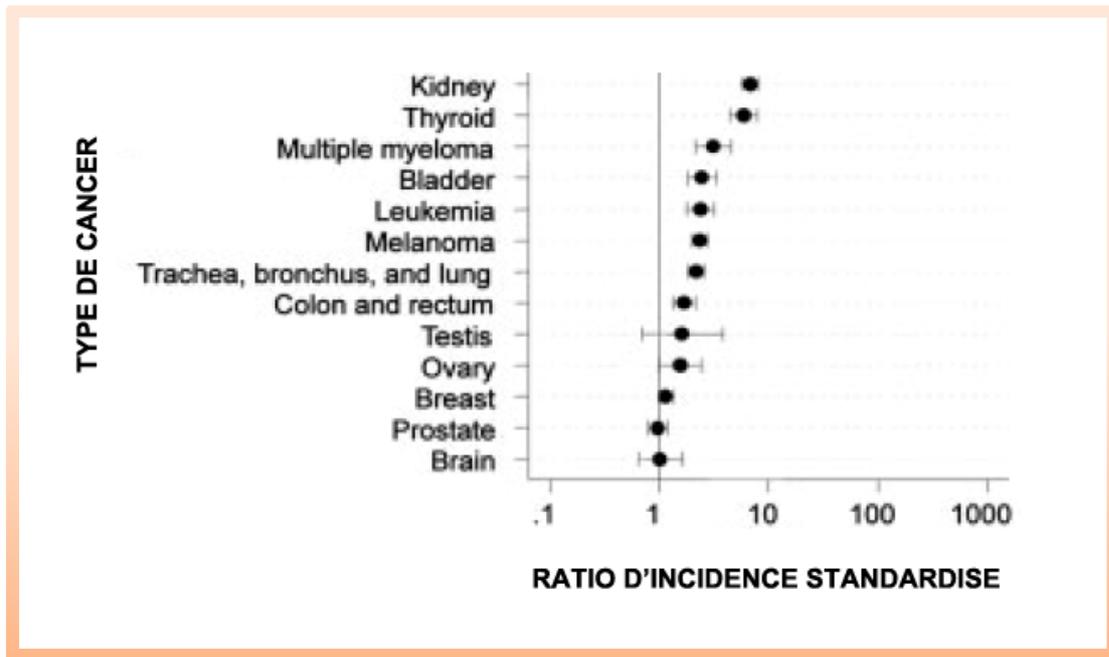
**Figure 27** La perte d'expression du CMH I est source de mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer du côlon.

(A,B,C) Expression de la chaîne lourde du CMH (HC10) révélée par IHC. Les coupes présentées sont représentatives de patients disposant d'une expression normale de CMH I (A) (241/348), une expression diminuée (B) (45/348) ou complètement absente (C) (62/348). D. Courbes de Kaplan Meier montrant la survie sans maladie en fonction du taux d'expression du CMH I pour les tous les patients. Une expression faible du CMH I est corrélée à une survie plus faible du patient. Adapté de (Watson et al., 2006a).

Il est important de noter que si la répression des molécules du CMH I semble prévenir une reconnaissance de la tumeur par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, cette modification devrait pouvoir activer les cellules NK présentes en intra tumoral. Pourtant, des études réalisées dans les cancers colorectaux ont montré que la perte de CMH I n'est pas particulièrement caractérisées

par un infiltrat NK plus important de la tumeur (Sandel et al., 2005). Une explication possible serait la répression de molécules activatrices associées au CMH des lymphocytes NK. En effet, cette problématique a été évaluée par une équipe allemande qui a pu démontrer qu'il existait une co-répression de molécules du HLA-A2 et d'ULBP2 dans les lignée du colon HCT116 par l'enzyme DNA methyltransferase (DNMT) (Sers et al., 2009). Cette répression conjointe pourrait expliquer les mauvais pronostiques associés à la perte du CMH I alors que théoriquement les lymphocytes NK sont activés dans ce contexte. Cette observation nous indique que l'évasion tumorale est conséquente à de multiples mécanismes redondants et atteint l'immunité dans sa globalité.

Cette idée ne peut que se confirmer lorsqu'on s'intéresse aux études de cohortes transplantées pour des organes solides. Chez ces patients, l'incidence de nombreux cancers non viraux est accrue par rapport à l'incidence attendue chez la population saine (Figure 28) (Vajdic and van Leeuwen, 2009). Des études complémentaires ont montré que cette incidence augmentée pouvait être expliquée partiellement par les traitements immunosuppresseurs administrés aux patients pour prévenir le rejet de la greffe. Ces drogues ciblent majoritairement l'activation des lymphocytes T en prévenant leur prolifération ou leur activation (Tableau 3). Par conséquent, ces patients atteints d'immunodéficiences liées aux traitements immunosuppresseurs présentent des risques de pathologies malignes accrus (Gatti and Good, 1971; Scadden, 2003).



**Figure 28 – Incidence de cancer pour les transplantés d’organes solides.**

Analyse réalisée sur un total de 31 977 patients receveurs de greffes, principalement de rein. Le suivi des patients s’étend de 6,8 à 8,5 années post-greffe. L’incidence de cancer non causé par des sources infectieuses (HPV, HIV, HHV8, EBV) est augmentée significativement chez les patients transplantés. Adapté de (Vajdic and van Leeuwen, 2009).

**Tableau 3 - Caractéristiques des drogues immunosuppressives principales utilisées en transplantation d'organe.**

La grande majorité des drogues utilisées en traitement de rejet affectent les cellules en forte prolifération. En effet, au cours d'un rejet de greffe, les lymphocytes T et B sont les acteurs principaux responsables de ces pathologies et leur nombre augmente de manière exponentielle à l'initiation de la maladie. Elles sont donc les cibles prioritaires des thérapies de contrôles de rejet. Adapté de (Halloran, 2004).

<b>Drogue</b>	<b>Mécanismes d'action</b>
<b>Cyclosporine</b>	Association à la cyclophiline Inhibition de la calcineurine Inhibition de l'activation T
<b>Tacrolimus (FK506)</b>	Association avec FKBP12 Inhibition de la calcineurine Inhibition de l'activation T
<b>Sirolimus (rapamycine)</b>	Association avec FKBP12 Inhibition de la rapamycine Inhibition de la prolifération T induite par l'IL-2
<b>Mycophenolate Mofetil (MMF)</b>	Inhibition de l'inosine monophosphate déshydrogénase Inhibition de la prolifération des lymphocytes T et B
<b>FK778</b>	Inhibition de la synthèse de pyrimidine Prévention de la prolifération des lymphocytes T et B
<b>Azathioprine</b>	Conversion en 6-mercaptopurine interférant avec la synthèse ADN Inhibition de la prolifération des lymphocytes T et B

L'ensemble des données exposées ici nous montre que la perte de molécules activatrices pour le système immunitaire semble être associée à la progression tumorale chez l'homme.

## 1.2 MODELES EXPERIMENTAUX

Suite aux observations cliniques réalisées dans le contexte d'étude de cohorte, la réalisation de modèles expérimentaux adaptés a permis de démontrer clairement l'implication de l'immunité dans la protection anti-tumorale.

Des études pionnières chez la souris ont montré que le transfert adoptif d'une population T déplétée en lymphocytes CD4+CD25+ chez une souris C567BL/6 permettait le développement d'une réponse immunitaire contre une tumeur syngénique induite (Shimizu et al., 1999). Cette réponse n'était pas observée chez les souris greffées avec la population totale. De la même façon, la déplétion de la population régulatrice par l'administration d'un anticorps anti-CD25 restaure une réponse anti-tumorale efficace (Onizuka et al., 1999). Après avoir obtenu la preuve du concept chez la souris, des thérapies ciblées ont vu le jour chez l'homme. La majorité de ces études emploie des protéines recombinantes toxiques créées pour cibler et détruire les cellules T exprimant fortement le CD25 sans affecter les cellules non impliquées dans la réponse immunitaire. Les protocoles utilisant LMB2 pour le traitement des mélanomes (Fragment variable d'un anticorps monoclonal couplé à l'exotoxine A de *Pseudomonas*) ou le Denileukin difitox (DAB389IL-2) dans les cancers rénaux (IL-2 couplée à un domaine enzymatique actif de la toxine diphtérique) offrent des résultats encourageants. L'administration de LMB2 chez des patients atteints de mélanomes métastatiques induit une réduction du nombre de Treg infiltrant de 79,1% dans les lésions évaluables (Powell et al., 2007). De la même façon, Les patients traités par difitox présentent une réduction des Treg périphériques et de leur immunosuppression dans les carcinomes rénaux (Mahnke et al., 2007). Cet effet est corroboré à une réponse cytotoxique CD8<sup>+</sup> accrue chez les patients atteints de mélanomes (Mahnke et al., 2007). La déplétion de Treg est par conséquent une méthode favorable au développement d'une réponse anticancéreuse efficace. La confirmation

d'un rôle prépondérant des Treg dans la progression tumorale a initié le développement de modèles expérimentaux plus spécifiques permettant de cibler directement les mécanismes qu'ils emploient pour contrôler les réponses T et inhiber leur efficacité.

On peut alors citer les études réalisées sur la molécule inhibitrice des cellules T, Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4). L'expression de CTLA-4 est constitutive chez les Treg. La présence de CTLA-4 sur les Treg est importante pour leurs fonctions répressives puisque les souris CTLA-4<sup>-/-</sup> possèdent des Treg aux fonctions inhibitrices diminuées par rapport aux souris sauvages (Sakaguchi et al., 2009). CTLA-4 est une molécule de costimulation exprimée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. La protéine est induite tardivement après l'activation des lymphocytes T (48h à 72h). CTLA-4 possède une forte affinité et avidité pour les molécules B7-1 et B7-2 et les séquestre pour prévenir leur interaction avec la molécule de costimulation CD28. L'engagement de CTLA-4 limite les fonctions des lymphocytes T par de nombreux mécanismes (e.g. inhibition de la production d'IL-2, production de TGF-β, prévention de la formation d'IS avec la cible) qui vont avoir pour conséquence une répression spécifique des fonctions effectrices des lymphocytes T concernés. Puisque l'induction de CTLA-4 est proportionnelle à l'intensité du signal du TCR, son induction pourrait contrôler préférentiellement les lymphocytes T spécifiques d'antigènes dérivés de tumeurs s'activant excessivement au contact des cancers. L'expression de CTLA-4 jouerait donc un rôle important dans l'immunoévasion aux lymphocytes T et cette hypothèse est appuyée par plusieurs modèles d'études murines. Les travaux de Kwon et coll. ont montré dans un modèle de cancer de prostate métastatique (TRAMP-C2) chez des souris C57BL/6, le rôle potentiel d'un blocage de la voie de répression CTLA-4. Le traitement par un anticorps dirigé contre CTLA-4 a permis de prolonger les fonctions effectrices des lymphocytes T, stimuler la régression tumorale (Kwon et al., 1997) et réduire le risque de rechute métastatique de 97,4% à 44% (Kwon et al., 1999). A noter que le traitement par anti-CTLA-4 semble plus efficace sur

des tumeurs à un stade précoce, renforçant le rôle précoce du SI dans la prévention du développement de tumeur *de novo* (Yang et al., 1997) Par la suite, d'autres modèles (fibrosarcomes, mélanomes) ont confirmé ces observations (Leach et al., 1996; Shrikant et al., 1999) et ouvert la voie d'une application thérapeutique chez l'homme en combinaison avec d'autres immunothérapies (Hurwitz et al., 2000). La production d'un anticorps humanisé a permis d'utiliser le blocage de la voie CTLA-4 sur des cohortes de patients atteints de cancer de la prostate et de mélanome (Phan et al., 2003; Ribas et al., 2005; Thompson et al., 2006). L'étude de Phan G.Q. publiée en 2003 concernait 14 patients porteurs de mélanomes métastatiques traités par anticorps neutralisant CTLA-4 (ipilimumab) et par une vaccination sous-cutanée utilisant des peptides de gp100. 43% des patients ont présenté une toxicité auto-immune de grade III ou IV associant essentiellement dermatite, entérocolite, hépatite et syndrome hypophysaire. Cette toxicité était malheureusement attendue puisque le traitement anti-CTLA-4 tend à activer une réponse immunitaire basée sur les lymphocytes T non-spécifiques de la tumeur. On retrouve à ce titre de nombreux effets secondaires de type auto-immunitaires dans les thérapies mises en place chez l'homme (Beck et al., 2006). Il a ainsi été observé des manifestations auto-immunes de type colites inflammatoires, vitiligos, dermatites, panhypopituitarisme et hypothyroïdie (Ribas et al., 2005).

**Tableau 4 – Principaux essais cliniques basés sur la neutralisation de CTLA-4.**

RO ; réponse objective. RC ; réponse complète.

Tumeurs	Patients	Traitement	RO	RC	Référence
<b>Mélanome</b>	24	IL2 & anti-CTLA4, 3mg/kg	22%	12,4%	(Maker et al., 2005b)
<b>Mélanome</b>	56	peptide vaccination & anti-CTLA4	13%	3%	(Maker et al., 2005a)
<b>Mélanome</b>	14	peptide vaccination & anti-CTLA4	21%	14%	(Phan et al., 2003)
<b>Mélanome et Carcinome Rénal</b>	198	anti-CTLA4	14%	0%	(Beck et al., 2006)
<b>Mélanome</b>	29	anti-CTLA4	14%	7%	(Ribas et al., 2005)

Ces constatations incitent à travailler sur les mécanismes immunitaires de manière contrôlée afin de ne pas compromettre l'intégrité de l'organisme par la production d'une auto-réactivité non souhaitée. Néanmoins, les résultats obtenus au cours de ces études démontrent que la compréhension de mécanismes physiologiques d'immunosuppression peut amener à l'établissement de thérapies anticancéreuses efficaces (Tableau 4).

Au cours de notre travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes de surveillance tumorale initiée par les cellules NK.

Un aspect important dans l'évaluation des fonctions anti-tumorale NK est la compréhension des mécanismes moléculaires régissant la formation des synapses immunologiques. En effet, de nombreuses données exposent l'importance que peuvent prendre les molécules intervenant dans la formation de l'IS pour la production d'une réponse immune efficace. Ce rôle est clairement exemplifié dans le cas des patients atteints de syndrome de Wiskott-Aldrich dont les multiples pathologies sont la conséquence de mutations plus ou moins importantes dans le gène codant pour la protéine WASp. Comme décrit précédemment, la mutation de WASp prévient son activité catalytique pour la polymérisation d'actine et par conséquent, le développement d'IS efficace par les cellules immunitaires (Ochs and Thrasher, 2006). Les patients atteints de syndrome de Wiskott-Aldrich sont soumis à de nombreuses pathologies plus ou moins sévères comme des poussées d'eczéma, des infections virales multiples et répétées, des réactions auto-immunitaires mais aussi des risques de développement tumoral accrus (Sullivan et al., 1994). Dans une étude réalisée en 1994 par Sullivan et al., il a été démontré une incidence de cancer accrue chez les patients présentant un phénotype de type WAS classique avec la protéine WASp non exprimée ou fortement tronquée. 13% des patients atteints du syndrome développèrent des pathologies malignes de type lymphomes B, suggérant une inefficacité du système immunitaire (Sullivan et al., 1994).

Des données plus précises issues d'études en IHC chez des patients atteints de cancer des poumons ont permis de mieux comprendre l'importance de la SI dans la surveillance des cancers. Elles montrent que les SI entre les cellules lymphocytaires T et les cellules tumorales sont altérées et peuvent expliquer la faible production d'IFN- $\gamma$  et la cytotoxicité diminuée des cellules immunitaires (Derniame et al., 2008). D'autre part, des études récentes associent la

production d'une quantité importante d'SI entre les lymphocytes T et leur cibles comme un bon pronostic pour le patient atteints de glioblastome (Barcia et al., 2009).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les synapses immunologiques peuvent être la cible des mécanismes d'immunoévasion tumoraux. Il est donc important de les étudier plus précisément.

## 2.1 RÔLE DE CX3CL1 DANS L'ÉTABLISSEMENT DE LA RÉPONSE ANTI-TUMORALE.

Les travaux de Nadine Fernandez ont clairement démontré l'interaction physiologique existante entre les cellules NK et les DC (Fernandez et al., 1999). Si les lymphocytes NK sont des cellules aux fonctions effectrices propres variées, ils sont aussi capables d'interagir avec les DC pour stimuler leur activation. L'activation des DC par les cellules NK est donc nécessaire pour engendrer une réponse immunitaire adaptative de type Th1 efficace et la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$ .

Dans notre travail (cf. Annexe Pallandre J.R. et al. 2008), nous montrons que l'absence de CX3CL1 est suffisante pour prévenir l'activation des lymphocytes NK par les DC. Des études réalisées précédemment par Borg et coll. (Borg et al., 2004) montraient clairement que la formation d'une DCNK-IS permettait la délivrance d'IL-12 par la DC au lymphocyte NK, conduisant à la production d'IFN- $\gamma$ . Alors que l'étude des différentes protéines impliquées dans l'interaction DC et NK et la formation physique de la DCNK-IS (e.g. ICAM-1 ou DC-SIGN) n'a pas semblé fournir des informations sur l'élément critique de l'interaction DCNK, nous nous sommes focalisés sur le rôle des chimiokines. Nous avons pu montrer que la fractalkine était importante dans les étapes d'initiation de la synapse immunologique DCNK-IS. La fractalkine nécessite les petites protéines G pour l'induction de son signal au niveau

intracellulaire. Le traitement des DC par la toxine pertussique, un inhibiteur des petites protéines G, démontre une réduction de l'activation des NK par les cellules dendritiques. La perte de CX3CL1 semble modifier profondément la structure synaptique puisque l'accumulation des résidus tyrosines phosphorylés (pTyr) et des protéines de réorganisation du cytosquelette (Vav, WASp) n'est pas observée en son absence. En outre, CX3CL1 affecte la localisation des KIR. La neutralisation de CX3CL1 dans des expériences de co-culture a clairement démontré une localisation préférentielle des KIR à l'interface synaptique, réprimant l'activation du lymphocyte NK. Ces protéines étant cruciales pour la formation d'une synapse active et une réponse immunitaire efficace, nos travaux placent CX3CL1 au centre de la régulation des IS NK. Ainsi, suite au contact DCNK, CX3CL1 permet la polymérisation du cytosquelette d'actine et contrôle la distribution des KIR en les excluant de la synapse. En son absence, Les KIR peuvent exercer leurs fonctions et précocement l'activation de la cellule NK par la DC.

Le rôle premier des protéines de type chimiokine est l'attraction et la migration des cellules sensibles par une voie dépendante des sous unités G $\alpha$ i. Des études réalisées par Molon B. et al. ont montré que les chimiokines pouvaient aussi agir sur la stabilité de l'interaction entre un lymphocyte T et une cellule de type APC. Les travaux réalisés montrent que la séquestration des récepteurs aux chimiokines dans la synapse entraîne une baisse de sensibilité aux chimiokines extérieurs et un prolongement de la synapse DC-T. De plus, ils expliquent que la localisation de CXCR4 et CCR5 dans la synapse est associé à un recrutement des protéines Gq (Molon et al., 2005). Les résultats obtenus indiquent un rôle plus complexe pour CX3CL1 que les chimiokines décrites précédemment. Cette cytokine agirait comme une molécule de costimulation et d'adhérence. Collectivement, nos travaux montrent que CX3CL1 est au centre de la formation de la synapse DCNK-IS activatrice et associée à une réponse NK efficace *in vivo*.

Certaines données font état du rôle de la fractalkine dans les pathologies cancéreuses. L'équipe de Zeng Y. et al. a pu montrer que la fractalkine était exprimée dans 90% des neuroblastomes étudiés dans leur protocole. Les études réalisées dans des modèles murins transgéniques pour CX3CL1 ont montrés que la fractalkine sécrétée par les cellules tumorales était capable d'induire la migration, l'adhérence et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des cellules immunitaires effectrices (lymphocytes T cytotoxiques et lymphocytes NK). Pourtant l'activité cytotoxique dirigée contre les cellules tumorales apparaissait limitée en l'absence d'un stimulus d'activation (ici l'IL-2), suggérant un mécanisme plus complexe de contrôle immunitaire (Zeng et al., 2007). La fractalkine reste néanmoins une cible de choix dans les thérapies anticancéreuses puisqu'elle est spécifique d'un seul récepteur de chimiokine, contrairement aux autres membres de la famille des chimiokines.

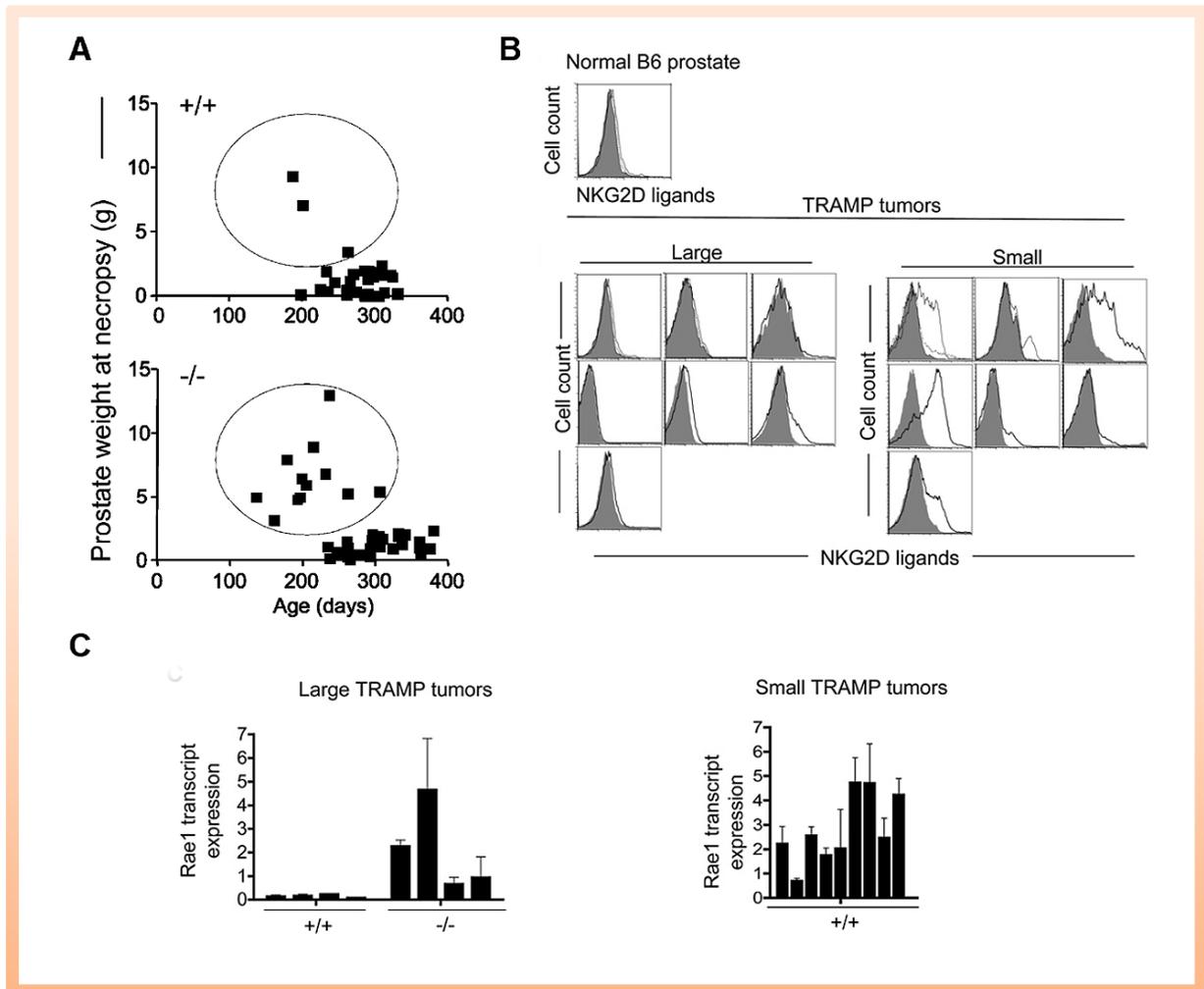
Après la production d'une synapse immunologique fonctionnelle avec sa cible, le lymphocyte NK a besoin d'intégrer des signaux d'activation pour exercer ces fonctions effectrices. Dans le contexte anti-tumoral, les ligands activateurs de NKG2D sont des molécules critiques pour le bon fonctionnement de l'immunosurveillance NK.

## 2.2 NKG2D, UNE VOIE CRITIQUE POUR LES FONCTIONS ANTI-TUMORALE NK

Les travaux de Guerra N. apportent des indications intéressantes quant au rôle physiologique du récepteur NKG2D dans le contrôle du développement tumoral des cellules NK (Guerra et al., 2008). La base de l'étude est la génération de souris déficientes pour le récepteur NKG2D. Les souris NKG2D<sup>-/-</sup> ne présentent aucune altération particulière au niveau des organes et ne développent pas de pathologies particulières. Les cellules NK issues de ces souris sont présentes en quantité normale dans la rate, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et le foie par rapport aux souris sauvages. Leur phénotype est identique à celui des souris sauvages

sauf pour le récepteur NKG2D qui est entièrement absent. Par la suite, afin d'étudier le rôle des lymphocytes NK NKG2D<sup>-/-</sup> dans l'immunosurveillance, des croisements entre les souris NKG2D<sup>-/-</sup> et TRAMP (transgenic adenocarcinoma mouse prostate) ont été réalisés. Les souris TRAMP développent spontanément des adénocarcinomes aux alentours de 18 semaines. Ces pathologies évoluent en tumeur métastatique vers 30 semaines (Huss et al., 2001). La caractérisation histologiques de ces carcinomes (i.e. disparité dans l'apparition et la différenciation des lésions), les désignent comme de bons modèles d'études comparables aux cancers de la prostate humain (Degrassi et al., 2007).

L'observation portait sur le taux de cancers agressifs apparaissant chez les souris doubles KO par rapport aux souris simplement déficientes pour NKG2D. De manière intéressante, les souris TRAMP déficientes pour NKG2D développèrent des tumeurs précoces larges et agressives à une fréquence trois fois plus élevée que les souris du groupe TRAMP contrôle (12/43 versus 3/33) (Figure 29). De plus les études histologiques réalisées sur les tumeurs révélèrent un état fortement différencié pour la majorité des tumeurs tardives apparaissant chez les souris TRAMP NKG2D<sup>-/-</sup>. Collectivement, ces données suggèrent que les souris déficientes pour NKG2D sont trois fois plus susceptibles que les souris TRAMP à l'émergence d'adénocarcinomes de la prostate hautement malins et agressifs. En complément de ces résultats, les analyses en cytométrie de flux réalisées sur les tumeurs extraites des souris TRAMP montrent une faible expression des NKG2DL (Figure 29B). Plus particulièrement, cette faible expression est retrouvée sur les petites tumeurs émergentes alors qu'elle est absente des tumeurs établies. Ces données suggèrent une immunoédition des tumeurs par des mécanismes dépendants de NKG2D. En outre, un plus grand taux d'ARNm Rae1 et une expression membranaire de MULT1 et Rae1 augmenté sont observés chez les tumeurs des souris TRAMP NKG2D<sup>-/-</sup> (Figure 29C). Ces données confortent également l'hypothèse d'une immunoédition des tumeurs par NKG2D.



**Figure 29 - Influence de NKG2D sur l'incidence de cancer de la prostate chez la souris TRAMP NKG2D<sup>-/-</sup>**

A. Chaque point représente le poids de la prostate à l'âge de la necropsie des individus TRAMP NKG2D<sup>+/+</sup> (en haut) (n=33) ou TRAMP NKG2D<sup>-/-</sup> (en bas) (n=43). De grandes tumeurs émergent précocement sont retrouvées plus fréquemment chez les souris TRAMP NKG2D<sup>-/-</sup>. B. Taux d'expression des NKG2DL sur les tumeurs récupérées chez les souris TRAMP NKG2D<sup>+/+</sup>. Les grandes tumeurs expriment faiblement les NKG2L qui sont retrouvés en grande quantité chez les petites tumeurs émergeant tardivement. Cette observation suggère une immunoédition des tumeurs à leur formation par des mécanismes dépendant NKG2D. Les tumeurs n'exprimant pas les NKG2DL évoluent en carcinomes de taille importante. C. Chez les souris TRAMP NKG2D<sup>-/-</sup> les grosses tumeurs expriment un taux élevé de transcrit Rae1 qui n'est pas retrouvé chez les grosses tumeurs des souris TRAMP. Cette donnée confirme l'hypothèse d'une immuno-sélection lié à l'expression des NKG2DL par la tumeur. Adapté de (Guerra et al., 2008).

Les travaux présentés ici établissent NKG2D comme une voie importante dans l'immunosurveillance des lymphocytes NK. A ce titre, un certain nombre de mécanismes décrits dans la littérature démontre une modulation, positive et négative, de l'activité liée à la voie NKG2D.

---

## 2.3 REGULATION DE LA VOIE NKG2D

---

### 2.3.1 ARCHITECTURE DES PROMOTEURS MICA ET MICB

A ce jour peu de données sont connues sur les mécanismes de régulations transcriptionnelles des NKG2DL. Les travaux se sont principalement focalisés sur les promoteurs de MICA et MICB sans réellement évaluer la régulation des ULBP. Une étude réalisée par l'équipe de Groh V. en 1996 présente l'existence d'éléments de réponse au choc thermique (HSE, séquence consensus : GAANN TTC) au niveau des séquences promotrices (-280/260 pb avant le site d'initiation de la transcription) de MICA et MICB (Groh et al., 1996). Cette observation s'inscrit dans le rôle des NKG2DL comme indicateur de stress. Par conséquent, un choc thermique ou l'induction de protéines de choc thermique à l'issue d'un stress est directement corrélé à l'induction de l'expression de MICA et MICB. D'autres données ont permis de compléter ces travaux par la suite. De manière intéressante, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques (17-allylaminogeldanamycin et radicicol) de la protéine hsp90 dans un modèle de myélomes multiples a permis une augmentation significative de l'expression de MICA et MICB (au niveau de l'ARNm et protéine) dans les lignées ciblées (Fionda et al., 2009). Des études complémentaires ont pu montrer l'activation concomitante de hsf-1 suite au traitement par les inhibiteurs de hsp90. En accord avec les résultats précédents, l'expression accrue de hsf-1 explique la stimulation de la synthèse d'ARNm et par la suite de protéine MICA et MICB observée. Il est à noter qu'aucune variation de l'expression des protéines de

la famille ULBP n'a pu être démontrée dans cette étude, indiquant une régulation non uniforme des NKG2DL. Enfin, l'induction d'un choc oxydatif (par traitement à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) favorise l'induction de MICA et MICB via l'utilisation in fine des HSE présents au sein des promoteurs de MICA (Venkataraman et al., 2007). La modulation des protéines de choc thermiques est par conséquent le premier modèle démontrant une influence directe sur la transcription des NKG2DL.

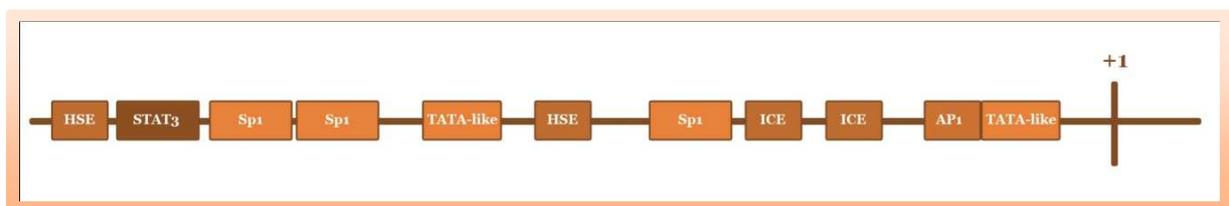
Par la suite, l'étude des éléments de réponses présents dans la région promotrice de MICA et MICB a aussi permis de mettre en évidence des séquences consensus pour le FT SP1 (séquence consensus :GGG(A/C/T)GGG) (Venkataraman et al., 2007; Zhang et al., 2009). L'utilisation de séquence mutée pour le site SP1 a démontré une diminution importante de l'expression de MICA et MICB (20-80% et 50-85% respectivement) suite à un choc thermique. Cette diminution est similaire à celle observée avec les HSE. SP1 est un élément important dans l'expression de hsp70 (Morgan, 1989). Les éléments SP1 et HSE semblent donc partager un rôle important dans la régulation de MICA et MICB suite à un choc thermique. Des éléments de réponses AP1 et ICE ont de même été décrits dans la littérature et constituent une base classique importante pour la transcription de nombreux gènes.

Un autre niveau de régulation de l'expression de MICA a été récemment développé par l'équipe de Bui J.D., la modulation de l'activité transcriptionnelle par les miRNA. Les miRNA sont de petit ARN non codant qui peuvent induire la dégradation d'ARNm cibles en s'appariant à la région non-traduite en 3' (3'-UTR). Ils ont pu montrer que la stimulation des cellules cibles par l'IFN- $\gamma$ , une cytokine connue pour son effet répresseur sur l'expression de MICA (Zhang et al., 2008), favorisait l'expression du miRNA 520b (Yadav et al., 2009). Par la suite, ils ont pu démontrer que le miRNA 520b pouvait se fixer à l'UTR-3' de MICA et également réguler la transcription du gène en s'associant à la région promotrice. Cette

découverte nous indique une régulation complexe et présente à de nombreux niveaux (ADN, ARN, protéique) des NKG2DL.

Au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence l'existence d'une voie de régulation transcriptionnelle supplémentaire de MICA et dépendante de la signalisation STAT3. Si la présence de la séquence consensus classique de STAT3 n'as pas été trouvé dans la région promotrice de STAT3, la présence d'une séquence consensus STAT3 alternative (TTCCNGG), récemment mise en avant (Chen et al., 2008a), a pu être mis en évidence. Les expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont pu démontrer la fixation de STAT3 à la séquence évaluée ce qui atteste d'un rôle actif de STAT3 dans la régulation du promoteur. Par la suite, nous avons également développés une étude basée sur la transfection de la séquence promotrice de MICA associée au gène de la luciférase. Nous avons pu observer un signal accru en luminescence lorsque les cellules transfectées étaient traitées par un inhibiteur de la voie STAT3, l'AG490. Ces données contribuent à renforcer le rôle de STAT3 en tant qu'inhibiteur actif de l'expression de MICA. Notre étude met en avant une des premières voies de répression transcriptionnelle de MICA par STAT3.

Collectivement, les données connues sur le promoteur de MICA sont résumées dans la figure suivante (Figure 30).



**Figure 30 – Représentation schématique du promoteur de MICA.**

La séquence est présentée avec les éléments de réponses confirmés dans la littérature. HSE : Heat Shock Element, ICE : CCAAT box-like element.

### 2.3.2 ACTIVATION DES NKG2DL

Certaines études ont montrées que les NKG2DL pouvaient être induit à la surface des cellules tumorales. Les travaux Zhang K. publiés en 2008 décrivent le rôle de l'IFN- $\alpha$  dans l'induction de MICA sur les lignées K562 et Hela (Zhang et al., 2008). Les travaux de Groh V. et Raulet D.H. ont clairement démontré l'implication des stress thermiques et oxydatifs dans l'expression des NKG2DL comme nous l'avons décrit précédemment (Gasser et al., 2005; Groh et al., 1996). Dans ce contexte, la voie de réparation de l'ADN ATM/ATR (impliquant l'arrêt du cycle par les kinases Chk1 et Chk2) joue un rôle important dans cette induction. Le mécanisme exact n'est cependant pas encore clairement élucidé.

Bien que les NKG2DL soient inductible et alors que certains travaux démontrent une surexpression des protéines MICA, MICB et ULBP dans certains type de cancer (Jordanova et al., 2008; Vetter et al., 2002; Watson et al., 2006b), De nombreuses études dévoilent la perte d'expression des NKG2DL par les cellules cancéreuses.

Ainsi, notre étude s'est focalisée sur l'évaluation des mécanismes de régulation négative des NKG2DL et les conséquences sur l'immunoévasion aux lymphocytes NK.

### 2.3.3 MODELE D'ETUDE ET IMPLICATION DANS L'IMMUNOEVASION DE LA VOIE NKG2D

Dans nos travaux, nous avons pu montrer que certaines lignées tumorales (HT29, 293T) réprimaient fortement l'expression des NKG2DL. Cette observation s'inscrit directement dans le rôle immunosélectif de NKG2D décrit précédemment. Des mécanismes tumoraux semblent privilégier l'émergence de clones moins immunogéniques pour se soustraire à la pression de sélection du système immunitaire. Nos données mettent en avant le rôle de STAT3 dans ces mécanismes d'évasion. En outre, il est intéressant de noter que ce sont les tumeurs à un stade

précoce qui expriment le plus fortement les ligands de NKG2D. Cette observation est en accord avec les travaux de Raulet et al. (Gasser et al., 2005) démontrant que la voie de dommage à l'ADN peut induire l'expression des NKG2DL. Nos travaux réalisés sur la lignée SV56 soutiennent cette observation et inscrivent STAT3 comme étant un médiateur contrôlant l'expression des NKG2DL à cette étape. En effet, nous avons pu montrer que la lignée SV56, une lignée cellulaire transformée à partir de cellules souches mésenchymateuses, exprimait certaines NKG2DL (MICA). Cette expression est cohérente avec le stress accompagnant les phénomènes de transformation. Pourtant, lorsqu'une forme constitutivement active de STAT3 (STAT3 C) est introduite dans la lignée SV56, on observe une forte répression de MICA. De plus, alors que l'application de stress génotoxiques (Irradiation  $\gamma$ ) stimule l'expression des NKG2DL dans les lignées contrôles, aucune induction n'est observée chez les lignées exprimant fortement STAT3. Nos données suggèrent un rôle décisif de STAT3 dans le contrôle de l'immunogénicité dépendante des NKG2DL des tumeurs naissantes.

A ce jour, différents mécanismes d'immunoévasion de la voie NKG2D ont été proposés dans la littérature. On peut citer la production de sNKG2DL par les lignées tumorales (Salih et al., 2002). Ces formes solubles sont issues d'un clivage par les MMP exprimés en forte quantité dans certaines pathologies. Elles sont retrouvées en concentration accrue dans le sérum de patients atteints de cancers d'origine variées (Groh et al., 2002). Dans nos travaux, nous avons montré la présence de sMICA dans les surnageants des cultures tumorales, en accord avec la littérature. Pourtant, nous n'avons pas observé de différences dans la production de sMICA par les lignées réprimant STAT3. Une hypothèse émise au cours de notre étude était que l'augmentation de l'expression d'ARNm MICA observée dans nos expériences en PCR quantitative en temps réel pouvait impliquer une production intensive de la forme sMICA dans le surnageant. Ce n'est pas le cas dans nos expériences puisque la forme membranaire de MICA est augmentée de manière préférentielle. STAT3 est connu pour réguler l'expression

des enzymes MMP1 et MMP2 (Itoh et al., 2006; Xie et al., 2004). Il est envisageable que l'inhibition de STAT3 puisse entraîner secondairement une répression de ces enzymes et expliquer l'absence de différence significative entre les productions de sMICA. Par conséquent, notre étude suggère une voie alternative complémentaire à la régulation des sNKG2DL par STAT3.

Un autre mécanisme de répression de la voie NKG2D implique le TGF- $\beta$ . Cette cytokine anti-inflammatoire aux effets pléiotropiques est non seulement capable de réprimer l'expression des récepteurs activateurs NK (NKp30, NKp46, NKG2D) (Castriconi et al., 2003; Kopp et al., 2009) mais elle peut aussi affecter l'expression des NKG2DL sur les cellules tumorales comme il a été démontré dans des études s'intéressant aux patients atteints de gliome (Crane et al.).

Dans notre travail, nous avons pu montrer que l'augmentation d'expression de MICA observée sur les lignées tumorales n'était pas associée à la signalisation directe du TGF- $\beta$ . En effet, des co-cultures ont été réalisées en présence d'un inhibiteur spécifique du récepteur ALK5 (Récepteur au TGF- $\beta$ 1 de type I). La présence d'inhibiteur a permis d'augmenter la production cytokinique des lymphocytes NK en IFN- $\gamma$  et ce quelque soit l'état d'expression de STAT3 dans nos lignées. Le TGF- $\beta$  est connu pour son rôle inhibiteur dans la voie NKG2D, cette influence est cependant tardive et lié à une exposition chronique des cellules tumorales ou immunitaires à la cytokine immunosuppressive. Dans les études réalisées par l'équipe de Moretta et al. L'effet répresseur des NCR n'est observable qu'à partir du 7<sup>ème</sup> jour de traitement au TGF- $\beta$  (Castriconi et al., 2003). L'étude de l'expression de NKG2D sur les lymphocytes NK dans notre contexte expérimental ne démontre aucun effet significatif à court terme (24h) alors que nous retrouvons l'effet documenté dans la littérature au 7<sup>ème</sup> jour de traitement. Cette observation ne contredit pas le rôle du TGF- $\beta$  dans la régulation négative

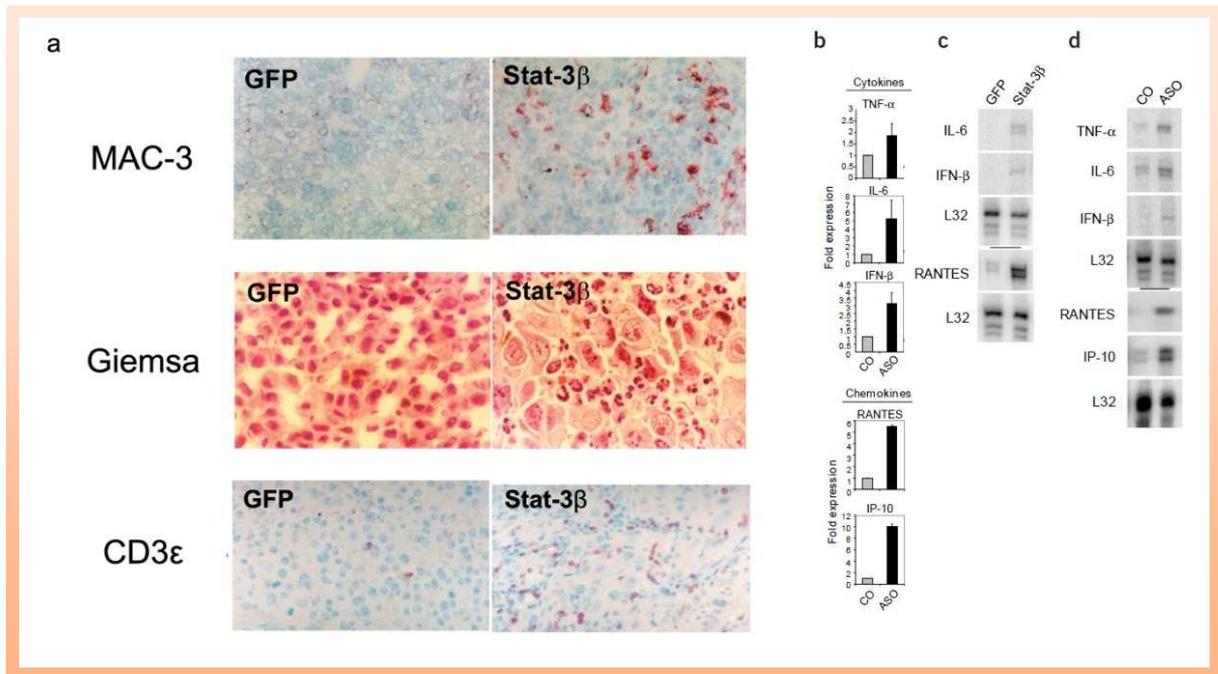
de NKG2D mais semble plutôt démontrer une différence dans la cinétique d'action des deux protéines. Si STAT3 pourrait agir rapidement dans le contrôle des voies NKG2D, ce rôle précoce serait ensuite complété par l'effet inhibiteur du TGF- $\beta$  à long terme. Ce point souligne le caractère redondant et synergique des signalisations visant à réprimer l'efficacité du système immunitaire.

Un point important de notre étude montre que tous les NKG2DL ne sont pas régulés de la même façon. Nous avons pu observer que la répression de STAT3 dans nos lignées tumorales affectait uniquement le ligand MICA. Ceci a déjà été démontré dans des modèles de gliomes (Eisele et al., 2006). Dans ces tumeurs, si le rôle du TGF- $\beta$  et des MMP est clairement impliqué dans la régulation des NKG2DL, le TGF- $\beta$  ne semble affecter que MICA, ULBP2 et ULBP4 alors que MICB, ULBP1 et ULBP3 restent inchangés en présence de cette cytokine. De la même façon, seule les expressions de MICA et ULBP2 sont atténuées par l'activité catalytique des enzymes MMP. En outre, on peut remarquer que le choc thermique favorise l'induction de MICA et MICB par l'intermédiaire de hsp70 mais ne modifie pas l'expression des ULBP chez les cellules tumorales traitées (Groh et al., 1999). L'altération spécifique de l'expression de MICA dans notre étude semble donc traduire une régulation complexe et en partie indépendante des différents NKG2D.

Si la découverte du rôle de STAT3 dans la régulation transcriptionnelle des NKG2DL est novatrice, cette molécule est depuis quelques années impliquée dans un réseau complexe d'immunoévasion. Notre travail apporte un axe complémentaire aux fonctions de STAT3 en tant que facteur immunosuppresseur.

#### 3.1 FONCTIONS IMMUNO-REGULATRICES VIA STAT3 EXPRIME PAR LES TUMEURS

Alors que STAT3 était connus pour son rôle oncogénique, ce sont les travaux de Wang et al. en 2004 qui ont données les preuves moléculaires du rôle de STAT3 dans la production d'un environnement immunosuppressive via son activité intrinsèque sur la cellule tumorale. Des tumeurs B16 traitées par la forme dominante négative de STAT3 se retrouvèrent fortement infiltrées par des cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles, DC, lymphocytes T) (Figure 31). De plus, l'inhibition de STAT3 dans ces tumeurs mena à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, RANTES) au niveau du site tumoral, indiquant que l'inhibition de STAT3 pourrait conduire à un important infiltrat immunitaire. En outre, l'activation de STAT3, par la voie Src ou l'expression d'une forme dominante mutante de STAT3, chez des fibroblastes inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires après activation au LPS.



**Figure 31 – La répression de STAT3 dans la tumeur B16 augmente l’infiltrat de cellules immunitaires et la production de cytokines inflammatoires associée.**

A. Lorsque l’activité STAT3 est bloquée dans les cellules tumorales B16 (surexpression du dominant négatif STAT3β), on observe un plus grand infiltrat de macrophages (MAC-3), de neutrophiles (Giemsa) et de lymphocytes (CD3ε) au niveau du tissu tumoral. B. L’expression des cytokines inflammatoires IL-6, IFN-β, TNF-α, RANTES et IP-10 est augmentée chez les cellules tumorales B16 (B), CT26 (C) et SCK-1 (D) transitoirement transfectées par un oligonucleotide anti-sens dirigé contre STAT3. Adapté de (Wang et al., 2004).

D’autre part, la production de cytokines anti-inflammatoires comme l’IL-10 est diminuée grandement lorsque STAT3 est inhibé dans les tumeurs B16, favorisant l’activation du système immunitaire (Bennaceur et al., 2009). Des travaux supplémentaires sur ce modèle ont montré que la répression de STAT3 permet *in fine* le recrutement de cellules immunitaires telles que les neutrophiles et macrophages grâce aux chimiokines produites par les cellules tumorales. Ainsi, d’autres études démontrent une corrélation inverse entre état de phosphorylation de STAT3 au niveau tumoral et infiltrat lymphocytaire (Burdelya et al., 2005). Ces données suggèrent que l’activité de STAT3 au sein même de la tumeur peut

promouvoir la production de cytokines anti-inflammatoires prévenant la production de cytokines stimulatrices pour le système immunitaire.

### 3.2 FONCTIONS IMMUNO-REGULATRICES VIA STAT3 DANS LES CELLULES IMMUNITAIRES AU NIVEAU INTRA-TUMORALE

Nous avons précédemment mis en évidence un rôle important de STAT3 dans les mécanismes oncogéniques et immunosuppresseurs liés à son activation au sein de la tumeur. Pourtant, STAT3 joue un rôle non négligeable dans les pathologies inflammatoires chroniques et peut aussi influencer la polarisation immunitaire des cellules lymphocytaires T. En effet, STAT3 assure la signalisation critique de la différenciation Th17 et peut moduler la production de lymphocytes Treg. Enfin, des analyses réalisées sur la régulation de l'IL-10 (Benkhart et al., 2000) et du TGF- $\beta$ 1 (Pallandre et al., 2007) montrent que les promoteurs de ces gènes possèdent des séquences consensus de fixation pour STAT3 et sont directement induits lorsque STAT3 est activé. Les données précédemment exposées suggèrent que STAT3 est capable d'influencer la réponse immunitaire dans un contexte physiologique. Au niveau de l'environnement tumoral, les travaux réalisés par Kortylewski M. en 2005 furent pionniers dans l'étude du rôle de STAT3 dans l'immunité anti-tumorale. Cette étude démontra que l'activité de STAT3 dans le système hématopoïétique affectait l'immunité sous de nombreux aspects. Le FT se trouve au centre des mécanismes permettant à la cellule tumorale d'échapper aux contrôles imposés par le SI.

#### 3.2.1 STAT3 AFFECTE LES FONCTIONS DE DC INFILTRANTES

Grâce à des données obtenues par Kortylewski, il a été montré que l'ablation de STAT3 chez les DC n'affecte pas leur nombre. En revanche, la répression de STAT3 dans les DC spléniques de souris portant des tumeurs induit une production bien plus importante d'IL-12

que les DC STAT3<sup>+/+</sup> des souris sauvages. La régulation de la sécrétion d'IL-12 par les DC a été confirmée par la suite dans les travaux réalisés sur l'inflammation pro et anti-carcinogène ou STAT3 est décrit comme directement impliqué dans la répression du gène IL12p35 (Kortylewski et al., 2009b). De plus, les DC de souris STAT3<sup>-/-</sup> sont capables de mieux activer les CD4 naïfs au cours d'expériences de réaction lymphocytaires mixtes (MLR). Ces résultats ont été confirmés ultérieurement par l'équipe de Chen (Cheng et al., 2003). Ils ont développé des expériences de co-cultures entre des DC traitées ou non par AG490, un inhibiteur chimique de la voie JAK2/STAT3, et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> transgéniques pour l'antigène de hémagglutinine (HA). Lorsque le peptide de l'HA était ajouté dans le milieu de culture, les DC étaient plus efficaces pour l'activation des lymphocytes T puisque une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  est observée (Cheng et al., 2003). Des études complémentaires ont démontré que les DC infiltrants la tumeur présentaient une expression moindre des CMH II, CD80 et CD86. Cet état immature peut expliquer leur faible aptitude à activer les lymphocytes T naïfs mis en contact. Enfin, les DC infiltrantes expriment fortement la forme phosphorylée de STAT3 en comparaison des DC de souris n'ayant pas reçues de tumeurs ou des DC extérieures à la tumeur. Une autre étude a pu montrer que la mise en présence de DC avec du surnageant issu de tumeur B16, exprimant la forme dominant négative de STAT3, STAT3 $\beta$ , favorisait une sécrétion augmentée d'IL-12 et une expression plus importante des molécules d'activation après stimulation par la maturation au LPS. Par ailleurs, la libération accrue de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  dans le microenvironnement tumoral « contrôlé » par STAT3 semble fournir le mécanisme expliquant comment le surnageant pourrait affecter l'état d'activation des DC par la phosphorylation de STAT3. Ainsi, dans des modèles de souris déficientes pour l'IL-6, on observe une plus grande quantité de DC matures (Park et al., 2004). Le traitement par l'IL-6 affecte directement l'état d'activation de la DC (Park et al., 2004). Parallèlement au DC conventionnelles, les pDC sont

également affectées par l'ablation de STAT3. Le nombre de pDC B220<sup>+</sup> est réduit au niveau des tumeurs de souris déficientes pour STAT3<sup>-/-</sup>. Les pDC sont retrouvées accrues en nombre dans certaines pathologies tumorales (cancer de l'ovaire) et semblent associées à la génération des Treg (Wei et al., 2005). STAT3 pourrait ainsi jouer un rôle dans les fonctions biologiques des pDC tolérogènes. L'abrogation de l'immunité anti-tumorale associée à STAT3 met donc en jeu une signalisation en cascade qui s'initie dans la cellule tumorale pour affecter par la suite les DC. L'ensemble de ces résultats supportent l'idée selon laquelle l'activation de STAT3 joue un rôle prépondérant dans l'inefficacité des DC infiltrantes.

### 3.2.2 LA SIGNALISATION DE STAT3 AFFECTE L'IMMUNITE INNEE ANTI-TUMORALE

Les travaux de Takeda ont clairement démontré que la signalisation STAT3 chez les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes NK infiltrant les tumeurs contribuait à la prévention de leurs fonctions anti-tumorales.

Ainsi, la présence de STAT3 actif dans les macrophages leur permet de prévenir le développement d'une réponse Th1 efficace (Takeda et al., 1999). En effet, dans un modèle d'entérocolite chronique, ils ont pu démontrer que la production d'IL-10 des macrophages et neutrophiles était partiellement responsable de la faible réponse Th1 observée dans ces maladies chroniques. Cette sécrétion d'IL-10 nécessite le signal transmis par STAT3 puisque son ablation dans un modèle murin restaure une réponse inflammatoire associée au profil Th1 (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) (Takeda et al., 1999). Par la suite, il a été montré que STAT3 pouvait aussi réprimer les propriétés de présentation d'antigène des macrophages (Cheng et al., 2003). Les macrophages issus de souris déficientes pour STAT3 stimulent plus efficacement l'activation de lymphocytes T naïfs mis en présence comme l'atteste la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ . De plus, la répression de STAT3 chez ces macrophages a permis de contrer l'anergie

de lymphocytes T transgéniques provenant de souris soumises à un challenge tumorale *in vitro*. Dans le cas des neutrophiles, leur activité cytolytique est significativement diminuée lorsque STAT3 est phosphorylé. En outre, il a été observé une augmentation de l'expression de FasL chez les neutrophiles de souris déficientes pour STAT3, augmentation associée à une meilleure cytotoxicité des neutrophiles. De manière analogue aux DC et macrophages, les neutrophiles intra-tumoraux expriment préférentiellement la forme phosphorylée de STAT3. L'analyse des souris STAT3<sup>-/-</sup> a montré que le nombre de neutrophile infiltrant la tumeur est accru en comparaison des souris sauvages.

Enfin, les lymphocytes NK sont aussi affectés dans leurs propriétés prolifératives lorsque STAT3 est actif. Dans les expériences réalisées, il a été remarqué une réduction d'au moins 25% des NK totaux. De plus, leurs fonctions cytotoxiques sont diminuées lorsqu'ils sont mis en présence de cellules cibles YAC-1, facilement lysées en conditions normales.

D'autres cellules myéloïdes de l'immunité innée sont affectées par la signalisation de STAT3. Ainsi, l'activation chronique de STAT3 dans les cellules myéloïdes suppressives (MSDC) conduit à la production de cytokines immunosuppressives (Chalmin et al.) mais aussi à la production de facteurs pro-angiogéniques stimulant la croissance tumorale (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009).

L'ablation de STAT3 dans le compartiment innée joue un rôle important dans le rétablissement d'une réponse immunitaire efficace. La tumeur infiltrée par les neutrophiles, macrophages et lymphocytes NK devient alors potentiellement immunogénique lorsque l'activité de STAT3 ne peut pas « freiner » les fonctions effectrices de ces cellules.

### 3.2.3 STAT3 REPRIME LA REPONSE LYMPHOCYTAIRE T ANTI-TUMORALE

Nous avons pu aborder l'implication de STAT3 dans la polarisation des lymphocytes T dans des conditions physiologiques. Dans un contexte de challenge tumoral, L'infiltration de lymphocytes régulateurs dans la tumeur est considérée comme un facteur important dans la progression tumorale et le maintien d'un microenvironnement immunosuppresseur. Lors de l'ablation de STAT3, on observe une forte réduction des Treg infiltrant la tumeur. En effet, Kortylewski et al. ont montré que la proportion de cellules  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  était considérablement réduite parmi le total de lymphocytes tumoraux. De plus, les lymphocytes  $CD8^+$  tumoraux extraits de souris  $STAT3^{-/-}$  soumises à une xéno greffe B16 et stimulés *in vitro* par un antigène exprimé par la lignée B16 (p15E) présentent des réponses en production cytokiniques  $IFN-\gamma$  bien plus importantes que les lymphocytes issus des souris sauvages. Ainsi, les lymphocytes infiltrant sont capables de développer des réponses anti-tumorales plus efficaces en l'absence de STAT3, efficacité accrue par la faible proportion de Treg présents (Kortylewski et al., 2005). Afin de mieux déterminer le rôle des lymphocytes dans l'importante réponse anti-tumorale observée, des souris reconstituées à l'aide de moelle de souris déficientes pour STAT3 ou sauvages ont été déplétées en lymphocytes  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  par administration d'anticorps monoclonaux puis injectées avec la lignée tumorale MB49. Alors que l'ablation de STAT3 a permis un rejet complet de la croissance tumorale, les effets anti-tumorales ont été largement perdus en l'absence de cellules  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  (Kortylewski et al., 2005). Les effets immunosuppresseurs anti-tumoraux de STAT3 au niveau du système immunitaire semblent donc *in fine* affecter principalement les lymphocytes T.

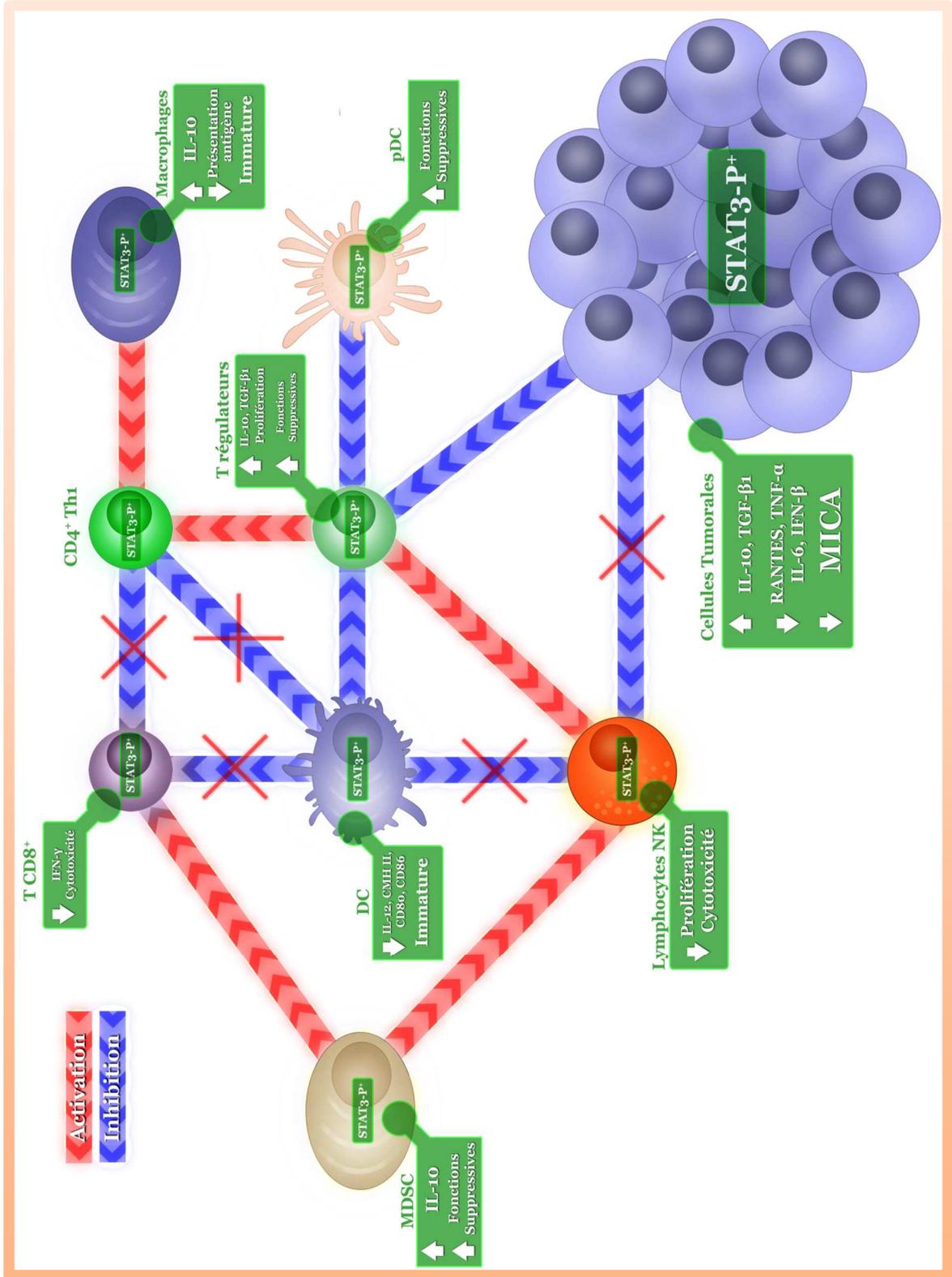
STAT3 joue un rôle non négligeable dans les propriétés de Treg. Les Treg infiltrant ont par ailleurs montrés une activité STAT3 supérieur à celle des Treg circulants. STAT3 favorise

leur production de cytokines pro-inflammatoires comme le TGF- $\beta$  et l'IL-10 (Benkhart et al., 2000; Pallandre et al., 2007).

---

#### 3.2.4 APPORT DE NOTRE ETUDE

Au cours de nos travaux, nous avons pu montrer que la signalisation active de STAT3 dans les cellules tumorales pouvait contribuer à contourner l'immunosurveillance NK. Un aspect peu étudié dans les fonctions immunosuppressives de STAT3 et les conséquences de son activité sur les fonctions des cellules NK. Si l'équipe de Kortylewski a pu montrer que l'activation de STAT3 chez les lymphocytes NK contribuait à la réduction de leur cytotoxicité face à des cibles YAC-1, aucune observation n'a été faite sur le mécanisme responsable de la faible activation des lymphocytes NK. Notre étude propose une voie de signalisation de STAT3 intrinsèque à la tumeur prévenant l'expression de la molécule MICA. Le processus de transformation tumorale s'accompagne d'un stress cellulaire important et est caractérisé par de nombreux dommages à l'ADN, favorisant l'expression de molécules de stress comme MICA (Groh et al., 1999). Nous avons pu montrer que la protéine STAT3 était capable de réprimer l'expression de MICA et ce, en dépit des stress thermiques et des irradiations occasionnés à la lignée immortalisée SV56. L'inhibition de ce NKG2DL par STAT3 pourrait donner une explication cohérente à l'incidence accrue de cancer associé à l'inflammation chronique. En effet, dans un environnement inflammatoire ou l'activité de STAT3 est omniprésente, cette activité de répression pourrait permettre l'émergence de clones peu immunogènes et la progression tumorale malgré la présence de cellules immunitaires effectrices. En outre, le récepteur NKG2D étant exprimé par d'autres cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, ce mécanisme de régulation pourrait être impliqués dans une régulation plus large de l'immunité. STAT3 apparait désormais comme un élément incontournable dans l'étude du micro-environnement tumorale (Figure 32).



**Figure 32 - STAT3 joue un rôle critique dans l'immunoévasion associée au microenvironnement tumoral.**

L'activation de STAT3 dans l'environnement tumoral influence non seulement l'activité des cellules immunitaires mais aussi les propriétés des cellules tumorales. L'activation de STAT3 dans les cellules tumorales réduit la sécrétion de protéines pro-inflammatoires (RANTES, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), réduit l'expression de MICA et stimule la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- $\beta$ 1). Le TGF- $\beta$ 1 produit favorise la polarisation en Treg des cellules T naïves présentes au site. Les Treg bénéficient de l'activité STAT3 qui augmente l'expression de FoxP3 et stimule leur propriétés anti-inflammatoires. Ils peuvent alors réprimer le développement d'une réponse Th1 efficace, l'activité cytotoxique NK et CTL. Les DC présentant une forte activité STAT3 ont un phénotype immature (faible production d'IL-12, molécule de costimulation CD80/CD86 faiblement exprimé) qui prévient l'activation des NK, des CTL et T CD4+ nécessaire à l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. D'autre part, les pDC exprimant STAT3 présentent des fonctions tolérogènes et activent la polarisation vers les Treg. Enfin, les macrophages et MDSC secrètent de grandes quantités d'IL-10 sous l'influence de STAT3, ce qui leur confère des fonctions suppressives critiques.



# *Perspectives*



Un nombre croissant de données illustre l'importance que prend l'immunité innée dans les mécanismes d'immunité anti-tumorale. Dans la continuité de ces travaux, nos résultats mettent en évidence un rôle important de STAT3 dans l'évasion à l'immunité anti-tumorale des lymphocytes NK. Ces données nous incitent à nous pencher sur plusieurs points dans nos futures études.

## 1 ASSOCIATION ENTRE POLYMORPHISME DE L'IMMUNITE INNEE ET PRONOSTIC

Comme nous l'avons abordé précédemment, les patients en transplantation d'organes solides présentent des risques accrus de développement cancéreux. L'augmentation de l'incidence des cancers semble en partie associée aux traitements immunosuppresseurs utilisés pour favoriser la tolérance vis-à-vis de l'organe transplanté. La contrepartie de ce traitement semble donc être la perte des fonctions anti-tumorales des cellules immunitaires réprimées. Pourtant, la majorité des traitements immunosuppresseur utilisés en clinique sont dirigés contre la réponse adaptative et préviennent la prolifération et l'activation des lymphocytes T. Ainsi, l'immunité innée et les lymphocytes NK n'apparaissent pas affectés dans leurs fonctions chez les patients subissant une transplantation sous immunosuppresseurs.

### 1.1 ETUDE PRELIMINAIRE

Nous avons à notre disposition une cohorte de patients transplantés rénaux ayant reçu un traitement immunosuppresseur basé sur la cyclosporine qui pourrait nous permettre de mieux évaluer les facteurs de risques associés à l'immunité innée et rendre un meilleur pronostic des patients traités pour les pathologies cancéreuses.

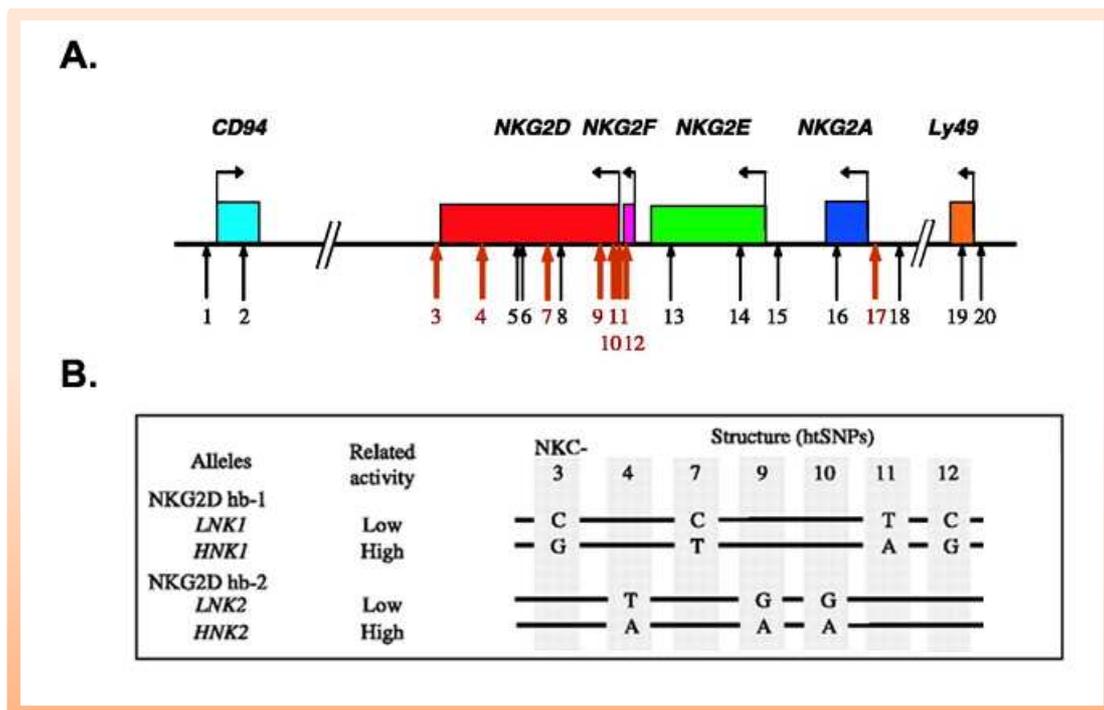
Puisque l'interaction entre CX3CR1 exprimé par les cellules NK et la fractalkine présente à la surface des DC est primordiale pour la genèse d'une synapse immunologique activatrice et le

développement de la réponse adaptative subséquente, notre équipe a étudié l'implication des polymorphismes du récepteur à la fractalkine, CX3CR1, dans les risques de cancers des patients transplantés rénaux (Pallandre et al., 2008). Le récepteur CX3CR1 dispose de deux polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) significativement représentés dans la population caucasienne et décrits dans la littérature (Faure et al., 2000). Le polymorphisme V249I correspond à une substitution de Valine en Isoleucine à la position 249 et le polymorphisme T280M correspond à une substitution de la thréonine par la méthionine en position 280. Les deux polymorphismes sont localisés dans la région transmembranaire et le polymorphisme T280M influence la stabilité du récepteur. Par exemple, le polymorphisme T280M modifie la charge du septième domaine transmembranaire ce qui pourrait modifier la conformation membranaire de la protéine. Les différents haplotypes observés chez les patients sont l'haplotype V249 T280 (majoritaire, 71,4%), l'haplotype I249 T280 (12,4%) et l'haplotype I249 M280 (16,2%). Dans nos études, nous avons pu montrer que pour les patients présentant un des deux haplotypes avec les altérations SNP décrites, le risque de cancer était plus important que les patients greffés avec une absence de polymorphisme. L'étude des polymorphismes des molécules impliquées dans les fonctions des cellules lymphocytaires NK est donc un atout important pour fournir un pronostic complet aux patients transplantés et mieux évaluer les risques encourus après la greffe.

Nous souhaitons étendre notre investigation aux molécules critiques de notre étude, à savoir NKG2D, MICA et STAT3. Nous caractériserons l'incidence de cancer associés aux polymorphismes des molécules de notre étude dans la cohorte de transplantés rénaux accessibles pour notre laboratoire. Certaines études ont mis en évidence des polymorphismes chez les molécules NKG2D, STAT3 et MICA.

## 1.2 POLYMORPHISMES ASSOCIES A NKG2D

Au cours d'une étude prospective sur l'incidence de cancer toutes causes confondues par l'équipe de Nakachi, l'évaluation des polymorphismes du gène NKG2D a montré que ce gène était affecté par 7SNP différents (Hayashi et al., 2006). La corrélation entre les fonctions cytotoxiques des patients et les SNP associés a permis d'isoler deux haplotypes différents NKG2D hb-1 et NKG2D hb-2. Ces haplotypes sont caractérisés par une combinaison de SNP particuliers préférentiellement retrouvées chez les patients présentant une faible cytotoxicité cellulaire (LNK1, LNK2) ou une forte cytotoxicité cellulaire (HNK1, HNK2). A l'issue de cette étude, il a été rapporté que l'haplotype HNK1/HNK1 présentait une incidence diminuée de cancer en comparaison de l'haplotype LNK1/LNK1 (Figure 33) (Hayashi et al., 2006).



**Figure 33 – Polymorphismes associés au gène de la protéine NKG2D.**

A. Après avoir caractérisé la séquence de la région génomique NKC des patients de la cohorte (n=3,625), les SNP présent dans plus de 10% des individus étudiés ont été retenus et nommés NKC-1 à 20. Les NKC-3, -4, -7, -9, -11 et -12 sont présents dans le gène NKG2D. B. L'analyse statistique des différentes combinaisons de SNP possibles a permis d'isoler deux haplotypes majeurs dont les variations alléliques sont corrélées à une cytotoxicité forte (HNK1, HNK2) ou faible (LNK1, LNK2).

Dans la suite de nos travaux, nous nous attacherons à évaluer la prévalence des polymorphismes NKG2D sur les risques de survenus de cancer dans notre cohorte de patients transplantés.

---

### 1.3 POLYMORPHISMES ASSOCIES A STAT3

En ce qui concerne STAT3, Si de nombreux SNP sont observés dans la littérature, il est nécessaire de sélectionner les plus pertinents par rapport à notre travail. Il a notamment été montré la présence de 6 polymorphismes (G3363a16 [G/T], G3363a3 [G/A]G3363a4 [C/G]rs1026916 [A/G] rs1905340 [A/C]rs957971 [C/G]) prédictifs du risque de survenue de pathologie asthmatique (Litonjua et al., 2005). Ce travail a suggéré l'association de ces polymorphismes dans les fonctions inflammatoires de STAT3 puisque il est un médiateur du signal de l'IL-13, une cytokine impliquée dans la pathogénèse de l'asthme. Les SNP étudiés semblent défavoriser les fonctions de STAT3 et sont associés à un risque moindre pour le développement d'asthme.

**Tableau 5 - Polymorphisme d'intérêt de STAT3.**

Les données issues de la littérature permettent de souligner l'importance de certains polymorphismes dans le développement de maladies inflammatoires ou liées à des mécanismes inflammatoires. La biologie altérée de STAT3 suite à la présence de SNP (plus particulièrement un haplotype homotypique) tend à diminuer le risque de maladies inflammatoires.

SNP	Variations nucléotidiques	Pathologies concernées	Observations
<b>G3363a16</b>	<b>G/T</b>	Asthme (FEV1)	Risque diminué
<b>G3363a3</b>	<b>G/A</b>	Asthme (FEV1)	Risque diminué
<b>G3363a4</b>	<b>C/G</b>	Asthme (FEV1)	Risque diminué
<b>rs1026916</b>	<b>A/G</b>	Asthme (FEV1)	Risque diminué
<b>rs1905340</b>	<b>A/C</b>	Asthme (FEV1)	Risque diminué
<b>rs957971</b>	<b>C/G</b>	Asthme (FEV1)	Risque diminué
<b>rs744166</b>	<b>A/G</b>	CD, UC	Risque diminué
<b>rs3816769</b>	<b>C/T</b>	CD	Risque diminué

De manière intéressante, une étude plus récente décrit deux SNP (rs744166 [A/G] et rs3816769 [C/T]) influençant les mécanismes inflammatoires dépendants de STAT3 (Ferguson et al.). Cette étude s'est attachée, entre autre, à caractériser le rôle des polymorphismes de STAT3 dans l'incidence des maladies inflammatoires, ici la maladie de Crohn. Les résultats obtenus démontrent que les individus homozygotes pour l'un ou l'autre des polymorphismes avaient moins de risque de développer la maladie de Crohn que les patients présentant l'haplotype courant. Ces données sont corrélées à une association importante du SNP rs744166 [A/G] avec l'émergence de colite ulcéreuse (Franke et al., 2008). Les points intéressants révélés dans l'étude de Ferguson sont la corrélation entre le SNP rs3816769 [C/T] et la sensibilité accrue des cellules aux dommages à l'ADN. La diminution des fonctions biologiques de STAT3 semblerait donc lier aux voies de dommages à l'ADN. Les voies de dommages à l'ADN sont capables de stimuler l'expression de la

molécule MICA et de certaines NKG2DL (Gasser et al., 2005). L'étude de ce polymorphisme en particulier apparait majeure dans l'évaluation des bénéfices potentiels de certains polymorphismes en transplantation. Nous nous attacherons à corrélérer les différents SNP mentionnés pour mieux appréhender le risque de survenue cancéreuse chez les patients transplantés.

---

#### 1.4 POLYMORPHISMES ASSOCIES A MICA

Bien que MICA ne soit pas aussi polymorphique que les molécules de CMH classique, il reste la molécule de CMH non classique la plus polymorphique avec plus de 65 allèles différents. Pourtant, tous ces allèles ne sont pas nécessairement pertinents en termes de structure et on dénombre bien moins de polymorphismes non conservatifs affectant les fonctions de la protéine (Tableau 6).

Puisque MICA est un ligand potentiel des lymphocytes T ( $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ ), les premières études se sont focalisées sur l'implication de sa variation allélique dans les maladies auto-immunitaires. Pourtant la plupart des études réalisées se sont concentrées sur des petites populations de patients d'ethnicité particulière qui ne reflètent pas forcément un comportement général des SNP MICA dans les pathologies traitées. La proximité du gène *mica* avec le gène *hla-b* a également posée quelques problèmes d'interprétations de données attribuant une significativité aux mutations de MICA lorsqu'il n'y en avait pas (déséquilibre d'association) (Petersdorf et al., 1999). Plus récemment, l'évaluation de l'impact des SNP de MICA a permis d'isoler certains cas pathologiques pertinents pour les polymorphismes MICA (Tableau 7).

**Tableau 6 - Polymorphismes non-synonymiques de MICA.**

Les substitutions d'acides aminés non-conservatives sont en gras et italique. Adapté de(Choy and Phipps).

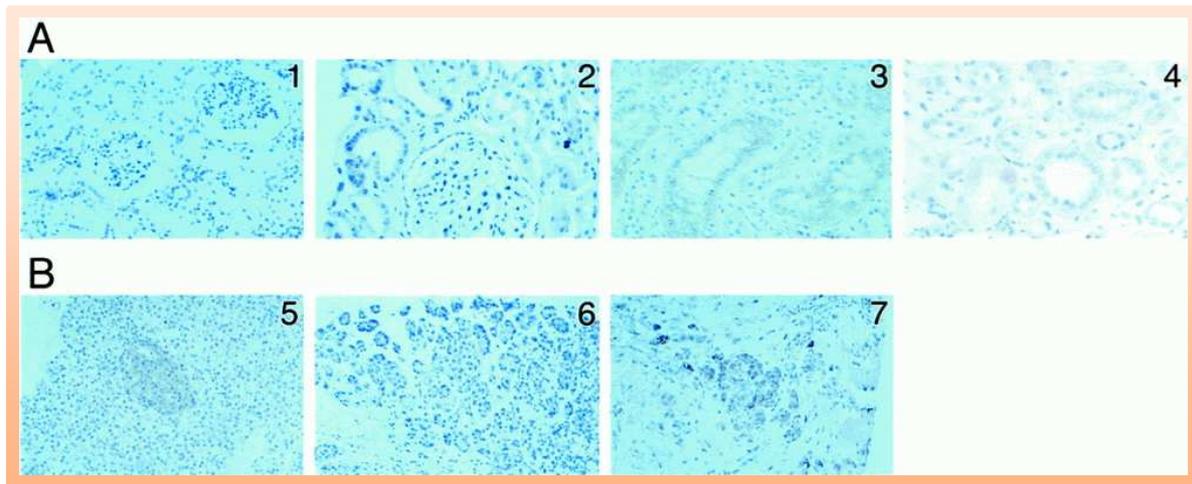
<b>A. Domaine <math>\alpha</math>1 (EXON 2)</b>	<b>Codon</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>24</b>	<b>26</b>	<b>36</b>			
	<i>MICA*001</i>	Arg	Trp	Thr	Val	Cys			
	<i>Variant :</i>	<b><i>Pro</i></b>	<b><i>Gly</i></b>	<b><i>Ala</i></b>	<b><i>Gly</i></b>	<b><i>Tyr</i></b>			
<b>B. Domaine <math>\alpha</math>2 (EXON 3)</b>	<b>Codon</b>	<b>90</b>	<b>91</b>	<b>105</b>	<b>114</b>	<b>122</b>	<b>124</b>	<b>125</b>	<b>129</b>
	<i>MICA*001</i>	Leu	Gln	Arg	Gly	Leu	Thr	Lys	Met
	<i>Variant</i>	Phe	<b><i>Arg</i></b>	Lys	<b><i>Arg</i></b>	Val	Ser	<b><i>Glu</i></b>	Val
	<i>Codon</i>	142	151	156	173	175	176	181	
	<i>MICA*001</i>	Val	Met	His	Lys	Gly	Val	Thr	
	<i>Variant</i>	Ile	Val	<b><i>Leu/Arg</i></b>	<b><i>Glu</i></b>	<b><i>Ser</i></b>	Ile	<b><i>Arg</i></b>	
<b>C. Domaine <math>\alpha</math>3 (EXON 4)</b>	<b>Codon</b>	<b>206</b>	<b>208</b>	<b>210</b>	<b>213</b>	<b>215</b>	<b>221</b>	<b>230</b>	<b>251</b>
	<i>MICA*001</i>	Gly	Tyr	Trp	Thr	Ser	Val	Trp	Gln
	<i>Variant</i>	Ser	Cys	Arg	Ile	Thr	Leu	Ser	Arg/Glu
	<i>Codon</i>	256	268	271					
	<i>MICA*001</i>	Arg	Ser	Pro					
	<i>Variant</i>	Ser	Gly	Ala					

**Tableau 7 – Certains SNP non synonymiques et non conservatifs sont associés avec des pathologies auto-immunes et cancéreuses**

SNP	Maladie	Effet	Population	Reference
<b>MICA-129met</b>	Spondylarthrite ankylosante	Susceptibilité	Algérienne	(Amroun et al., 2005)
<b>MICA-213thr, MICA-251 gln</b>	Cancer du col de l'utérus	Protection	Thai (Nord-Est)	(Jumnainsong et al., 2007)
<b>MICA-129val</b>	GVHD Chronique	Susceptibilité	Française	(Boukouaci et al., 2009)
<b>MICA-129val</b>	Carcinome nasopharynx	du Susceptibilité	Tunisienne	(Douik et al., 2009)
<b>MICA-173lys</b>	Arthrite rhumatoïde	Protection	Française, Allemande	(Kirsten et al., 2009)

Dans l'évaluation de MICA en tant que biomarqueur de la maladie du greffon contre l'hôte chronique (cGVHD), il a été montré une association significative entre la présence du polymorphisme MICA 129V/V et l'incidence de cGVHD (Boukouaci et al., 2009). Les résultats concernant les pathologies cancéreuses démontrent une grande complexité des SNP. Dans les cancers du col de l'utérus, les polymorphismes MICA-213T et MICA-251G sont protecteurs alors que le polymorphisme MICA-129V/V est synonyme d'une plus grande susceptibilité à la formation de carcinome du nasopharynx (Douik et al., 2009; Jumnainsong et al., 2007).

Certaines études ont déjà été effectuées pour évaluer l'expression des protéines MICA et MICB en tant que bio-marqueur dans les greffes allogéniques du pancréas et du rein. L'équipe de Groh et coll. a pu montrer que sur un total de 53 individus transplantés rénaux et 19 transplantés pancréatiques, l'expression des protéines MIC était détectée chez les patients ayant fait un rejet de greffe (Figure 34) (Hankey et al., 2002). Chez les greffés rénaux, les études histologiques ont montré que les 11 patients atteints de rejet aigu étaient positifs pour MICA/B. La même observation était faite pour 9/11 patients en rejet chronique et 7/10 en rejet aigu et chronique. Il est important de remarquer que les patients n'ayant pas rejeté leur rein étaient négatifs pour 7/10 d'entre eux.



**Figure 34 – Détection par IHC de l’expression de MICA/B sur allogreffes de rein (A) et de pancréas (B).**

1. Rein normal; 2. Necrose tubulaire aigue; 3. Rejet aigu; 4. Rejet Chronique; 5. Pancréas normal; 6. Rejet Aigu; 7. Rejet chronique.

Ces données fournissent un lien possible entre expression de MICA et MICB et le rejet de greffe. De tels résultats sont encourageants et démontrent l’intérêt particulier à étudier les polymorphismes de MICA pertinents chez notre cohorte de patients transplantés.

Collectivement, notre travail sera de fournir de possibles marqueurs de pronostics basés sur l’étude des polymorphismes NKG2D, STAT3 et MICA. Les résultats devraient nous permettre de mieux évaluer le pronostic des patients greffés.

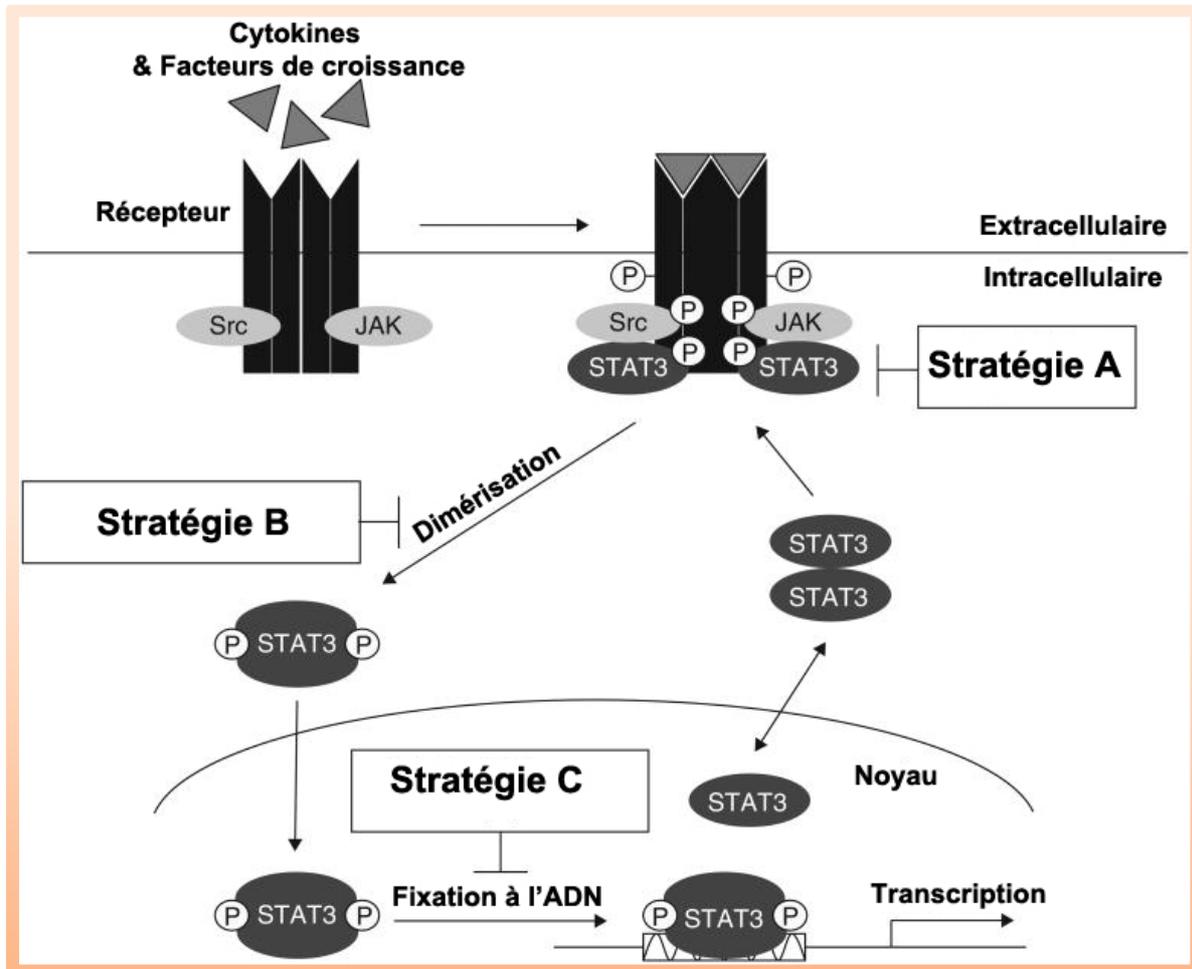
### 2.1 RATIONNEL

Le dernier aspect que nous souhaitons développer après cette étude sera le transfert de nos données expérimentales dans des modèles de thérapies cellulaires. Un certain nombre de travaux s'attellant au contrôle de STAT3 dans les pathologies malignes a déjà été initié et décrit dans la littérature.

En effet, les facteurs de transcription sont des cibles de choix pour les thérapies anticancéreuses puisqu'ils sont en aval de multiples voies de signalisation. Leur action influence un grand nombre de paramètres favorisant le développement cancéreux. Par conséquent, l'activation fréquente de STAT3 dans de nombreux cancers fait de lui un candidat de choix pour les thérapies ciblées. Des études préliminaires ont montré la faisabilité de cette approche. L'ablation du gène *Stat3* dans les cellules tumorales ou les cellules présentes dans l'environnement tumoral (i.e. macrophages tumoraux) inhibe la carcinogénèse et le développement des tumeurs établies (Bollrath et al., 2009; Chan et al., 2004; Kortylewski et al., 2005). Bien que la répression prolongée de STAT3 chez la souris soit associée à des maladies auto-immunitaires de type Th1, une perspective thérapeutique a pu être démontrée (Kortylewski et al., 2005). Ainsi, l'ensemble de ces études suggèrent que si l'inhibition complète et prolongée de STAT3 peut conduire à de pathologies sévères, le contrôle de l'activité STAT3 pendant une durée limitée pourrait promouvoir une réponse anti-tumorale sans générer d'effets secondaires délétères.

Contrairement aux protéines de type tyrosine kinases, le facteur de transcription STAT3 ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque. Cette particularité limite les molécules utilisables pour prévenir les fonctions de STAT3. Dans le cas des tyrosines kinases,

l'utilisation de molécules « substrats » comme l'Imatinib permet de saturer le site à activité tyrosine kinase de l'enzyme, empêchant la fixation des substrats et réprimant l'activité enzymatique. Dans le cas de STAT3, l'approche est différente et doit s'orienter vers l'interruption des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN (Figure 35).



**Figure 35 – Stratégies utilisées pour les approches thérapeutiques ciblant STAT3.**

Les approches thérapeutiques envisagent le contrôle de STAT3 selon 3 stratégies différentes, 2 spécifiques et 1 partiellement aspécifique et indirecte. La stratégie A consiste à prévenir la phosphorylation des éléments précédents l'activation de STAT3 (gp130, JAK) ou prévenir la phosphorylation de STAT3. La contrepartie de cette méthode est le peu de spécificité des produits utilisés (inhibiteurs de JAK Kinase) dont l'utilisation peut avoir de fortes pertes de spécificités. La stratégie B est le ciblage des domaines SH2 nécessaires pour la dimérisation de STAT3. Les molécules utilisées peuvent être peptidiques et mimer la séquence reconnue par le domaine SH2 (PY\*LKTK, ISS 610) ou non peptidique (STA21, S3I-201). La stratégie C consiste à prévenir l'interaction entre STAT3 et l'ADN pour contenir ses propriétés de régulation de la transcription par des molécules variées (IS3 295, CPA-1, CPA-7) (D'après Yue P. et al. 2009).

Jusqu'à présent, deux approches directes ont été évaluées. La première approche (Figure 25 : Stratégie B) consiste à cibler les domaines SH2 de STAT3 qui favorise la formation et la stabilité des dimères STAT3. Le criblage virtuel de composés *in silico* contre des modèles moléculaires de STAT3 (sur la base de sa structure cristallographique) ont permis d'isoler des molécules peptidiques et non-peptidiques interagissant spécifiquement avec la région SH2 de STAT3. Cette interaction permet de bloquer sa dimerisation et a déjà été réalisé et a permis d'obtenir des données prometteuses (Mandal et al., 2009; Turkson et al., 2004a; Turkson et al., 2001). L'approche peptidique présente l'avantage d'une grande spécificité d'action en s'associant au domaine SH2 de STAT3. Dans la plupart de cas, l'utilisation de peptides inhibiteurs de dimerisation a permis une régression de la croissance tumorale (PY\*LKTK (Turkson et al., 2001), Y\*LPQTV (Coleman et al., 2005)) et dans certains cas, l'induction d'apoptose des cellules surexprimant STAT3 a pu être démontré. On retrouve néanmoins une limitation due à la faible stabilité des composés utilisés et le peu de perméabilité des cellules à ces produits, conduisant à une efficacité biologique limitée. Des modifications structurales seront nécessaires pour outrepasser ces limitations. L'intérêt des inhibiteurs non-peptidiques est leur plus grande disponibilité pour la cellule. Ces petites molécules sont plus facilement diffusées au niveau cellulaire pour agir rapidement. Pourtant si ces produits sont plus accessibles à la cellule, ils sont moins sélectifs et leurs effets secondaires peuvent être un problème à évaluer dans chaque cas. La caractérisation des candidats non-peptidiques obtenus grâce à ces différentes études a montré qu'ils étaient capables d'inhiber la régulation génique associée à STAT3, bloquer la progression tumorale et induire l'apoptose (STA-21 (Song et al., 2005), S3I-201, ISS610 (Turkson et al., 2004a)) des cellules exprimant fortement la forme activée de STAT3 (Schust et al., 2006; Turkson et al., 2001; Turkson et al., 2005; Turkson et al., 2004b). Le STA-21 inhibe la dimérisation de STAT3 *in vitro* et supprime la transduction des gènes (Bcl-xL, survivine, cycline D1) et la prolifération des cellules associées à la

signalisation de STAT3 dans les modèles de cancer du sein (Song et al., 2005) ou de sarcomes (Chen et al., 2007a). Des dérivés du STA21 nommés « compounds 1 » et « compounds 2 » ont pu montrer des aptitudes similaires dans l'inhibition de l'activité STAT3 de cellules de cancer de la prostate (Bhasin et al., 2008).

Pourtant, si le concept d'un ciblage spécifique de STAT3 a fait ces preuves *in vitro* ou dans des modèles murins *in vivo*, aucun inhibiteur de STAT3 n'a pu passer à l'étape de l'étude clinique et des études complémentaires sont requises pour y parvenir.

La seconde approche évaluée (Figure 35 : Stratégie C) est l'utilisation d'inhibiteurs prévenant l'interaction physique de STAT3 avec l'ADN. Peu d'études utilisent cette stratégie thérapeutique mais certaines données dans la littérature parlent du potentiel de cette approche. Un composé dérivé du Platine, l'IS3 295, est décrit comme un agent bloquant l'interaction entre STAT3 et l'ADN. Si le mode d'action n'est pas clair, la conséquence d'un traitement à l'IS3 295 est la réduction de la phosphorylation Y705 de STAT3 (Turkson et al., 2005). De plus, l'induction dépendante de STAT3 de la transcription des gènes de la cycline D1 et de Bcl-xL est prévenue dans les modèles de fibroblastes NIH3T3/v-Src et dans les carcinomes du sein présentant une activité STAT3 constitutive (Turkson et al., 2005). D'autres dérivés du Platine ont été identifiés *in vitro* comme potentiellement inhibiteurs de l'interaction STAT3-ADN (CPA-1, CPA-7, Platine (IV) Tetrachloride). A ce jour, seul CPA-7 a été évalué *in vivo* et montre une régression tumorale du cancer du côlon CT26 à une dose de 5 mg/kg, justifiant l'attention portée à ces complexes dérivés du Platine. Un point critique à évaluer reste la toxicité de ces composés *in vivo* (Turkson et al., 2004b).

Une approche alternative étudiée est l'utilisation d'oligonucléotides et de molécules (ARN anti-sens, petits ARN interférant (siRNA) ou de nucléotides « leurres » de fixation à l'ADN (ODN)) pour inhiber l'expression de STAT3 ou son activité transcriptionnelle (Barton et al.,

2004; Leong et al., 2003; Ling and Arlinghaus, 2005). L'utilisation d'ODN permet de mimer la séquence consensus et après intrusion dans la cellule, l'ODN exogène peut entrer en compétition avec la fixation à la séquence endogène. Cette approche a déjà été éprouvée avec des FT comme NF- $\kappa$ B (Son et al., 2007) et AP-1 (Moriyama et al., 2008). La séquence 5'-CATTTCCTCGTAAATC-3' semble bloquer spécifiquement la transcription de gène sous la dépendance de STAT3 (Cycline D1, c-Myc, Bcl-xL) par ce mécanisme de leurre dans des modèles de cancer variés (poumon, foie, prostate, head and neck cancer)(Leong et al., 2003; Xi et al., 2005). La limite de ces approches réside dans la fiabilité de la délivrance du peptide siRNA au niveau de la cible (tumorale ou autre). Si des études animales suggèrent un potentiel évident (Sen et al., 2009), l'application clinique reste encore éloignée. Une étude récente et originale a démontré la faisabilité du ciblage de STAT3 par l'utilisation d'un conjugué entre un agoniste au TLR9 et un siRNA dirigé contre STAT3 (Kortylewski et al., 2009a). Ce conjugué particulier favorise la livraison locale du siRNA et la répression de STAT3 dans les cellules immunitaires. Cette approche a permis d'améliorer les effets anti-tumoraux des cellules immunitaires affectées.

Une autre classe d'inhibiteurs de STAT3 utilisés concerne les produits d'origines naturelles et leurs dérivés possédant des propriétés anti-tumorales comme par exemple la cucurbitacine, le resveratrol, la galiellalactone, la curcumine et l'indirubine (Blaskovich et al., 2003; Kotha et al., 2006; Nam et al., 2005). Ces composés, si ils inhibent les fonctions de STAT3, ne sont pas exempts d'autres cibles oncogéniques, ce qui les rends moins spécifiques. On peut noter leur faculté à réprimer l'activité JAK (Figure 35 : Stratégie A) de manière directe et indirecte (Ghoreschi et al., 2009). La voie des JAK Kinases étant cruciale pour le développement des cancers liés à l'inflammation et la signalisation STAT3, on ne peut que souligner l'intérêt de cette approche complémentaire dans des traitements basés sur l'inhibition de STAT3.

Au vu des résultats obtenus pendant notre travail de thèse et des données disponibles dans la littérature, STAT3 apparaît comme un candidat de choix pour la production de thérapie anticancéreuse efficace. En étudiant les différentes approches abordées précédemment, notre équipe a choisi d'évaluer l'efficacité de molécules chimiques présentant une affinité avec le domaine SH2 de STAT3.

---

## 2.2 DONNEES PRELIMINAIRES

Des screening basés sur l'affinité théorique de composés chimiques avec le domaine SH2 de STAT3 ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de l'IFR85 de Strasbourg. Nous avons pu isoler une centaine de candidats présentant une affinité importante avec STAT3 et sur la base de leur solubilité nous avons pu isoler 10 candidats intéressants pour notre modèle d'étude. Les tests préliminaires nous ont permis de retenir une molécule efficace pour la suite de notre travail, l'inhibiteur 5 (i5).

Nous avons réalisés des tests de prolifération MTT sur la lignée HT29 en présence de l'inhibiteur 5 ou de molécules inhibitrices contrôles (Figure 36). Les tests MTT mesurent la viabilité des cellules puisque le MTT est un sel réduit par une enzyme mitochondriale et c'est le produit de cette réduction, le Formazan, qui est dosé par test colorimétrique.

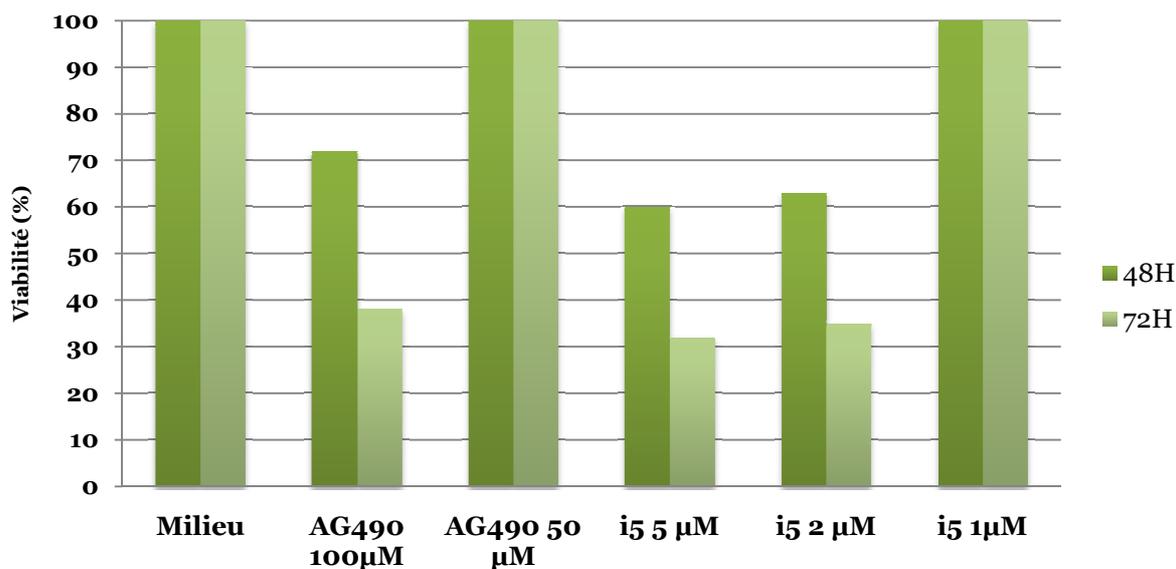
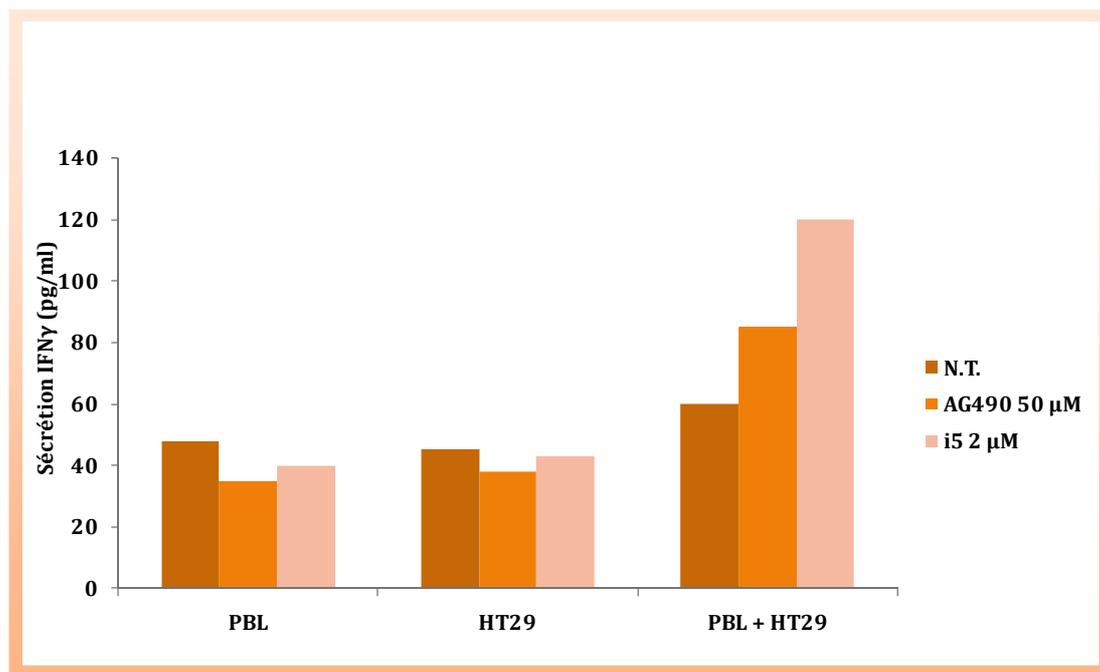


Figure 36 – Test de viabilité MTT sur la lignée HT29 traitée par différents inhibiteurs de STAT3.

A des concentrations bien plus faibles, l'i5 est capable d'induire un taux d'apoptose similaire à l'AG490 à 48H et 72H.

L'évaluation de l'inhibiteur 5 a montré un effet important de la molécule sur la réduction de la viabilité cellulaire de la lignée HT29 (60% de viabilité cellulaire à 48H et 32% à 72H). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour l'inhibiteur de la voie JAK/STAT, AG490 avec des doses 10 fois plus importantes. L'i5 semble présenter une plus forte efficacité à des doses plus faibles.

La suite de notre évaluation s'est intéressée à la caractérisation de l'i5 dans notre modèle. Au cours de notre étude, nous avons pu montrer que la répression de STAT3 dans la lignée tumorale HT29 restaurait une cytotoxicité efficace des cellules NK. Cette cytotoxicité améliorée est corrélée à l'expression accrue de NKG2DL à la surface des cellules HT29. Puisque NKG2D est exprimé par les cellules NK mais aussi les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, nous avons choisi d'évaluer l'intérêt d'une inhibition de STAT3 dans la lignée HT29 sur l'efficacité anti-tumorale de lymphocytes totaux du sang périphérique (PBL) (Figure 37).



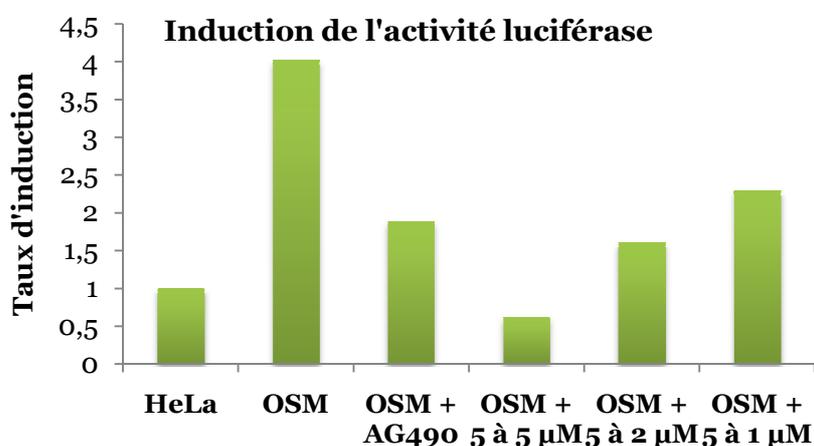
**Figure 37 – Quantification de l'IFN- $\gamma$  sécrétés par des lymphocytes mis en présence de cellules HT29 traitées par des inhibiteurs de STAT3.**

Les cellules HT29 sont prétraitées pendant 24h soit par l'AG490 ou l'i5 aux doses décrites. Elles sont ensuite mises en présence de PBL pendant 24h et la production d'IFN- $\gamma$  est évaluée par ELISA.

Le prétraitement pendant 24h des cellules HT29 avec les inhibiteurs de STAT3 (AG490 et i5) stimule la production de la cytokine inflammatoire IFN- $\gamma$  par les PBL mis en présence. De manière analogue avec l'expérience de viabilité, si l'AG490 et l'i5 présentent des effets similaires, le prétraitement à l'i5 est capable de stimuler la production d'IFN- $\gamma$  par les PBL à des concentrations dix fois inférieures. Ainsi, à la concentration de 2 $\mu$ M, l'i5 stimule une production deux fois supérieure à la condition contrôle (120 pg/ml contre 60 pg/ml) alors que l'AG490 à 50  $\mu$ M ne parvient pas à accroître l'activation au-delà de 83 pg/ml. L'i5 est donc un composé intéressant puisque son efficacité est importante à des concentrations faibles.

Enfin, des expériences de gène rapporteur luciférase ont été réalisées pour évaluer la capacité de l'i5 à prévenir l'activité de STAT3. Pour cela, nous avons utilisé la lignée Hela-STAT3-Luc qui est transfectée par un vecteur luciférase sous la dépendance d'un promoteur modifié et composé de multiples éléments de réponses à STAT3 (Figure 30). Les cellules Hela-

STAT3-Luc sont soumises à un prétraitement avec l'OSM pendant 6h afin de stimuler l'activation de STAT3. La stimulation par OSM induit une activité transcriptionnelle 4 fois supérieure à la condition non traitée comme le prouve l'intensité de luminescence observée. Lorsque les cellules sont prétraitées pendant 24h avec l'AG490 avant la stimulation OSM, l'induction de luciférase est diminuée de moitié. Si le prétraitement est réalisé avec l'i5, on peut observer une répression totale de l'activité de transcription de STAT3 avec une concentration de 5  $\mu\text{M}$ . Cette donnée nous indique que l'i5 est capable de fortement réprimer l'activité de STAT3 en prévenant la dimérisation du FT.



**Figure 38 – Expérience de gène rapporteur luciférase sur la lignée Hela-STAT3-Luc traitée par différents inhibiteurs de STAT3.**

La lignée Hela-Luc-STAT3 est prétraitée pendant 6h avec 10  $\mu\text{M}$  d'OSM, un inducteur de STAT3. Lorsque les cellules sont prétraitées pendant 24h avec l'AG490 ou l'i5, on observe une forte réduction du taux d'induction de la transcription associée à STAT3.

Les données préliminaires obtenues présentent l'i5 comme une molécule de choix pour l'inhibition spécifique de STAT3. Cette molécule est non-peptidique et semblerait plus facilement disponible pour l'intrusion au niveau cellulaire. Nos travaux seront poursuivis pour évaluer l'intérêt de l'i5 dans des modèles de xénogreffes *in vivo*.

# ***Conclusion Générale***



Au cours de ce travail, portant sur les mécanismes d'immunosurveillance et d'immunoévasion, nous nous sommes intéressés aux cellules lymphocytaires NK. Nous avons émis l'hypothèse d'un rôle actif des oncogènes dans l'établissement des mécanismes immuno-évasifs des cellules tumorales. D'après les données de la littérature, nous avons choisi d'évaluer le rôle potentiel du facteur de transcription STAT3 pour notre hypothèse.

L'analyse de l'activité de STAT3 dans les cellules tumorales (HT29, 293T), immortalisées (SV56) ou non malignes (PBL) nous a permis de révéler un mécanisme de régulation des NKG2DL par la protéine STAT3. En effet, STAT3 peut s'associer spécifiquement à une séquence consensus au niveau du promoteur de MICA. Cette interaction réduit considérablement la transcription de la protéine MICA. Par conséquent, les cellules présentant une forte activité STAT3 pourraient diminuer leur sensibilité à la cytotoxicité des lymphocytes NK. STAT3 est directement associé à l'induction de cancers associés aux inflammations chroniques. Ce nouveau mécanisme permet de mieux comprendre le rôle de STAT3 dans la production d'un environnement plus tolérogène déjà décrit dans la littérature (cytokines anti-inflammatoires TGF- $\beta$ 1, IL-10). L'expression de STAT3 par les cellules en cours de transformation pourrait faire partie des voies moléculaires permettant de briser l'étape d'équilibre et favoriser l'évasion tumorale.

La possibilité d'évaluer les polymorphismes des différents acteurs de notre étude (STAT3, NKG2D, MICA) nous indiquera si les observations *in vitro* sont d'une importance significative pour les patients greffés. Enfin, la poursuite de notre travail nous permettra de développer des inhibiteurs spécifiques dirigés contre STAT3 pour tester la faisabilité d'une telle approche en adjuvant du protocole NK existant à Besançon.



# ***Bibliographie***



## A

- Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumuller, H., Luking, C., Mysliwicz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D.H., Rocken, M., and Mocikat, R. (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 106, 338-344.
- Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X.J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M., and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77, 63-71.
- Almeida, C.R., and Davis, D.M. (2006). Segregation of HLA-C from ICAM-1 at NK cell immune synapses is controlled by its cell surface density. *J Immunol* 177, 6904-6910.
- Amroun, H., Djoudi, H., Busson, M., Allat, R., El Sherbini, S.M., Sloma, I., Ramasawmy, R., Brun, M., Dulphy, N., Krishnamoorthy, R., *et al.* (2005). Early-onset ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism. *Hum Immunol* 66, 1057-1061.
- Anderson, P., Caligiuri, M., Ritz, J., and Schlossman, S.F. (1989). CD3-negative natural killer cells express zeta TCR as part of a novel molecular complex. *Nature* 341, 159-162.
- Andrews, D.M., Scalzo, A.A., Yokoyama, W.M., Smyth, M.J., and Degli-Esposti, M.A. (2003). Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat Immunol* 4, 175-181.
- Andzelm, M.M., Chen, X., Krzewski, K., Orange, J.S., and Strominger, J.L. (2007). Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *J Exp Med* 204, 2285-2291.
- Arase, H., Mocarski, E.S., Campbell, A.E., Hill, A.B., and Lanier, L.L. (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296, 1323-1326.
- Arneson, L.N., Brickshawana, A., Segovis, C.M., Schoon, R.A., Dick, C.J., and Leibson, P.J. (2007). Cutting edge: syntaxin 11 regulates lymphocyte-mediated secretion and cytotoxicity. *J Immunol* 179, 3397-3401.
- Arneson, L.N., Segovis, C.M., Gomez, T.S., Schoon, R.A., Dick, C.J., Lou, Z., Billadeau, D.D., and Leibson, P.J. (2008). Dynammin 2 regulates granule exocytosis during NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 181, 6995-7001.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., *et al.* (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6, 515-523.
- Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., and Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31, 2680-2689.
- Askar, M., Avery, R., Corey, R., Lopez, R., Thomas, D., Pidwell, D., Eghtesad, B., Miller, C., Fung, J., and Zein, N.N. (2009). Lack of killer immunoglobulin-like receptor 2DS2 (KIR2DS2) and KIR2DL2 is associated with poor responses to therapy of recurrent hepatitis C virus in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 15, 1557-1563.
- Augugliaro, R., Parolini, S., Castriconi, R., Marcenaro, E., Cantoni, C., Nanni, M., Moretta, L., Moretta, A., and Bottino, C. (2003). Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 33, 1235-1241.
- Aziz, M.H., Manoharan, H.T., Church, D.R., Dreckschmidt, N.E., Zhong, W., Oberley, T.D., Wilding, G., and Verma, A.K. (2007). Protein kinase Cepsilon interacts with signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3), phosphorylates Stat3Ser727, and regulates its constitutive activation in prostate cancer. *Cancer Res* 67, 8828-8838.

## B

- Backers, K., Blero, D., Paternotte, N., Zhang, J., and Erneux, C. (2003). The termination of PI3K signalling by SHIP1 and SHIP2 inositol 5-phosphatases. *Adv Enzyme Regul* 43, 15-28.
- Bacon, L., Eagle, R.A., Meyer, M., Easom, N., Young, N.T., and Trowsdale, J. (2004). Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol* 173, 1078-1084.
- Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D.E., and Spies, T. (1994). A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6259-6263.
- Bajenoff, M., Breart, B., Huang, A.Y., Qi, H., Cazareth, J., Braud, V.M., Germain, R.N., and Glaichenhaus, N. (2006). Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 203, 619-631.

- Banerjee, P.P., Pandey, R., Zheng, R., Suhoski, M.M., Monaco-Shawver, L., and Orange, J.S. (2007). Cdc42-interacting protein-4 functionally links actin and microtubule networks at the cytolytic NK cell immunological synapse. *J Exp Med* *204*, 2305-2320.
- Barao, I., Hudig, D., and Ascensao, J.L. (2003). IL-15-mediated induction of LFA-1 is a late step required for cytotoxic differentiation of human NK cells from CD34+Lin- bone marrow cells. *J Immunol* *171*, 683-690.
- Barcia, C., Jr., Gomez, A., Gallego-Sanchez, J.M., Perez-Valles, A., Castro, M.G., Lowenstein, P.R., Barcia, C., Sr., and Herrero, M.T. (2009). Infiltrating CTLs in human glioblastoma establish immunological synapses with tumorigenic cells. *Am J Pathol* *175*, 786-798.
- Barton, B.E., Karras, J.G., Murphy, T.F., Barton, A., and Huang, H.F. (2004). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther* *3*, 11-20.
- Barton, K., Muthusamy, N., Fischer, C., Ting, C.N., Walunas, T.L., Lanier, L.L., and Leiden, J.M. (1998). The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* *9*, 555-563.
- Baume, D.M., Robertson, M.J., Levine, H., Manley, T.J., Schow, P.W., and Ritz, J. (1992). Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur J Immunol* *22*, 1-6.
- Beck, K.E., Blansfield, J.A., Tran, K.Q., Feldman, A.L., Hughes, M.S., Royal, R.E., Kammula, U.S., Topalian, S.L., Sherry, R.M., Kleiner, D., *et al.* (2006). Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* *24*, 2283-2289.
- Beck, R.C., Padival, M., Yeh, D., Ralston, J., Cooke, K.R., and Lowe, J.B. (2009). The Notch ligands Jagged2, Delta1, and Delta4 induce differentiation and expansion of functional human NK cells from CD34(+) cord blood hematopoietic progenitor cells. *Biol Blood Marrow Transplant* *15*, 1026-1037.
- Beck, S., and Barrell, B.G. (1988). Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* *331*, 269-272.
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., Cabrera, N., *et al.* (2003). Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* *130*, 65-74.
- Benkhart, E.M., Siedlar, M., Wedel, A., Werner, T., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (2000). Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* *165*, 1612-1617.
- Bennaceur, K., Chapman, J.A., Touraine, J.L., and Portoukalian, J. (2009). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their effect in dendritic cells. *Biochim Biophys Acta* *1795*, 16-24.
- Bennett, I.M., Zatsepina, O., Zamai, L., Azzoni, L., Mikheeva, T., and Perussia, B. (1996). Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16-functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. *J Exp Med* *184*, 1845-1856.
- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Kliever, E., and Wajda, A. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* *91*, 854-862.
- Besson, C., Roetynck, S., Williams, F., Orsi, L., Amiel, C., Lependeven, C., Antoni, G., Hermine, O., Brice, P., Ferme, C., *et al.* (2007). Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study. *PLoS One* *2*, e406.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235-238.
- Bhasin, D., Cisek, K., Pandharkar, T., Regan, N., Li, C., Pandit, B., Lin, J., and Li, P.K. (2008). Design, synthesis, and studies of small molecule STAT3 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* *18*, 391-395.
- Biassoni, R., Pessino, A., Bottino, C., Pende, D., Moretta, L., and Moretta, A. (1999). The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* *29*, 1014-1020.
- Billadeau, D.D., Upshaw, J.L., Schoon, R.A., Dick, C.J., and Leibson, P.J. (2003). NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol* *4*, 557-564.
- Binstadt, B.A., Billadeau, D.D., Jevremovic, D., Williams, B.L., Fang, N., Yi, T., Koretzky, G.A.,

- Abraham, R.T., and Leibson, P.J. (1998). SLP-76 is a direct substrate of SHP-1 recruited to killer cell inhibitory receptors. *J Biol Chem* *273*, 27518-27523.
- Binstadt, B.A., Brumbaugh, K.M., Dick, C.J., Scharenberg, A.M., Williams, B.L., Colonna, M., Lanier, L.L., Kinet, J.P., Abraham, R.T., and Leibson, P.J. (1996). Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity* *5*, 629-638.
- Birkeland, S.A., Storm, H.H., Lamm, L.U., Barlow, L., Blohme, I., Forsberg, B., Eklund, B., Fjeldborg, O., Friedberg, M., Frodin, L., and et al. (1995). Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* *60*, 183-189.
- Biron, C.A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* *320*, 1731-1735.
- Bix, M., Liao, N.S., Zijlstra, M., Loring, J., Jaenisch, R., and Raulet, D. (1991). Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* *349*, 329-331.
- Blaskovich, M.A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., and Sefti, S.M. (2003). Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res* *63*, 1270-1279.
- Bloch-Queyrat, C., Fondaneche, M.C., Chen, R., Yin, L., Relouzat, F., Veillette, A., Fischer, A., and Latour, S. (2005). Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J Exp Med* *202*, 181-192.
- Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodaysky, I., Bovin, N.V., and Porgador, A. (2004). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol* *173*, 2392-2401.
- Boggs, S.S., Trevisan, M., Patrene, K., and Geogopoulos, K. (1998). Lack of natural killer cell precursors in fetal liver of Ikaros knockout mutant mice. *Nat Immun* *16*, 137-145.
- Bollrath, J., Pheesse, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., et al. (2009). gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* *15*, 91-102.
- Bonertz, A., Weitz, J., Pietsch, D.H., Rahbari, N.N., Schlude, C., Ge, Y., Juenger, S., Vlodaysky, I., Khazaie, K., Jaeger, D., et al. (2009). Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. *J Clin Invest* *119*, 3311-3321.
- Borg, C., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H., Charrier, S., Ryffel, B., Cambi, A., Figdor, C., Vainchenker, W., et al. (2004). NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* *104*, 3267-3275.
- Bossi, G., and Griffiths, G.M. (2005). CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin Immunol* *17*, 87-94.
- Boukouaci, W., Busson, M., Peffault de Latour, R., Rocha, V., Suberbielle, C., Bengoufa, D., Dulphy, N., Haas, P., Scieux, C., Amroun, H., et al. (2009). MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. *Blood* *114*, 5216-5224.
- Bradley, M., Zeytun, A., Rafi-Janajreh, A., Nagarkatti, P.S., and Nagarkatti, M. (1998). Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas- tumor cells. *Blood* *92*, 4248-4255.
- Brady, C.S., Bartholomew, J.S., Burt, D.J., Duggan-Keen, M.F., Glenville, S., Telford, N., Little, A.M., Davidson, J.A., Jimenez, P., Ruiz-Cabello, F., et al. (2000). Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* *55*, 401-411.
- Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., et al. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* *206*, 1495-1503.
- Braunstein, J., Brutsaert, S., Olson, R., and Schindler, C. (2003). STATs dimerize in the absence of phosphorylation. *J Biol Chem* *278*, 34133-34140.
- Brilot, F., Strowig, T., Roberts, S.M., Arrey, F., and Munz, C. (2007). NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15Ralpha. *J Clin Invest* *117*, 3316-3329.

Brodin, P., and Hoglund, P. (2008). Beyond licensing and disarming: a quantitative view on NK-cell education. *Eur J Immunol* 38, 2934-2937.

Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W., and Darnell, J.E., Jr. (1998). Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 18, 2553-2558.

Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Wen, Z., Schreiber, R.D., and Darnell, J.E., Jr. (1996). Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7673-7678.

Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., and Darnell, J.E., Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303.

Bronte-Tinkew, D.M., Terebiznik, M., Franco, A., Ang, M., Ahn, D., Mimuro, H., Sasakawa, C., Ropeleski, M.J., Peek, R.M., Jr., and Jones, N.L. (2009). *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer Res* 69, 632-639.

Browning, M., Petronzelli, F., Bicknell, D., Krausa, P., Rowan, A., Tonks, S., Murray, N., Bodmer, J., and Bodmer, W. (1996). Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 47, 364-371.

Bryceson, Y.T., March, M.E., Barber, D.F., Ljunggren, H.G., and Long, E.O. (2005). Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med* 202, 1001-1012.

Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., and Long, E.O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159-166.

Buentke, E., Heffler, L.C., Wilson, J.L., Wallin, R.P., Lofman, C., Chambers, B.J., Ljunggren, H.G., and Scheynius, A. (2002). Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin--*Malassezia*-influenced cell interaction. *J Invest Dermatol* 119, 850-857.

Bukowski, J.F., Woda, B.A., Habu, S., Okumura, K., and Welsh, R.M. (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J Immunol* 131, 1531-1538.

Burdelya, L., Kujawski, M., Niu, G., Zhong, B., Wang, T., Zhang, S., Kortylewski, M., Shain, K.,

Kay, H., Djeu, J., *et al.* (2005). Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. *J Immunol* 174, 3925-3931.

Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.

Burshtyn, D.N., Shin, J., Stebbins, C., and Long, E.O. (2000). Adhesion to target cells is disrupted by the killer cell inhibitory receptor. *Curr Biol* 10, 777-780.

Buzza, M.S., and Bird, P.I. (2006). Extracellular granzymes: current perspectives. *Biol Chem* 387, 827-837.

## C

Cabrera, T., Collado, A., Fernandez, M.A., Ferron, A., Sancho, J., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (1998). High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* 52, 114-123.

Cabrera, T., Pedrajas, G., Cozar, J.M., Garrido, A., Vicente, J., Tallada, M., and Garrido, F. (2003). HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens* 62, 324-327.

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

Carlin, L.M., Eleme, K., McCann, F.E., and Davis, D.M. (2001). Intercellular transfer and supramolecular organization of human leukocyte antigen C at inhibitory natural killer cell immune synapses. *J Exp Med* 194, 1507-1517.

Carlsten, M., Norell, H., Bryceson, Y.T., Poschke, I., Schedvins, K., Ljunggren, H.G., Kiessling, R., and Malmberg, K.J. (2009). Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *J Immunol* 183, 4921-4930.

Carr, W.H., Rosen, D.B., Arase, H., Nixon, D.F., Michaelsson, J., and Lanier, L.L. (2007). Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol* 178, 647-651.

Casey, T.M., Meade, J.L., and Hewitt, E.W. (2007). Organelle proteomics: identification of the exocytic machinery associated with the natural killer cell

- secretory lysosome. *Mol Cell Proteomics* 6, 767-780.
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4120-4125.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., *et al.* (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105-115.
- Cenit, M.C., Alcina, A., Marquez, A., Mendoza, J.L., Diaz-Rubio, M., de Las Heras, V., Izquierdo, G., Arroyo, R., Fernandez, O., de la Concha, E.G., *et al.* STAT3 locus in inflammatory bowel disease and multiple sclerosis susceptibility. *Genes Immun.*
- Cerwenka, A., Baron, J.L., and Lanier, L.L. (2001). Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11521-11526.
- Chalifour, A., Jeannin, P., Gauchat, J.F., Blaecke, A., Malissard, M., N'Guyen, T., Thieblemont, N., and Delneste, Y. (2004). Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104, 1778-1783.
- Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J.P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., *et al.* Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 120, 457-471.
- Chan, C.J., Andrews, D.M., McLaughlin, N.M., Yagita, H., Gilfillan, S., Colonna, M., and Smyth, M.J. (2009). DNAM-1/CD155 Interactions Promote Cytokine and NK Cell-Mediated Suppression of Poorly Immunogenic Melanoma Metastases. *J Immunol.*
- Chan, K.S., Sano, S., Kiguchi, K., Anders, J., Komazawa, N., Takeda, J., and DiGiovanni, J. (2004). Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *J Clin Invest* 114, 720-728.
- Chapman, T.L., Heikeman, A.P., and Bjorkman, P.J. (1999). The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 11, 603-613.
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326, 986-991.
- Chen, C.L., Loy, A., Cen, L., Chan, C., Hsieh, F.C., Cheng, G., Wu, B., Qualman, S.J., Kunisada, K., Yamauchi-Takahara, K., and Lin, J. (2007a). Signal transducer and activator of transcription 3 is involved in cell growth and survival of human rhabdomyosarcoma and osteosarcoma cells. *BMC Cancer* 7, 111.
- Chen, X., Allan, D.S., Krzewski, K., Ge, B., Kopcow, H., and Strominger, J.L. (2006). CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10346-10351.
- Chen, X., Trivedi, P.P., Ge, B., Krzewski, K., and Strominger, J.L. (2007b). Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6329-6334.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., *et al.* (2008a). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133, 1106-1117.
- Chen, X.M., Xu, X.Q., Sun, K., Hallett, W.H., Zhao, J.D., and Zhang, D.L. (2008b). NKG2D ligands expression and NKG2D-mediated cytotoxicity in human laryngeal squamous carcinoma cells. *Scand J Immunol* 67, 441-447.
- Cheng, F., Wang, H.W., Cuenca, A., Huang, M., Ghansah, T., Brayer, J., Kerr, W.G., Takeda, K., Akira, S., Schoenberger, S.P., *et al.* (2003). A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 19, 425-436.
- Cheng, G.Z., Zhang, W.Z., Sun, M., Wang, Q., Coppola, D., Mansour, M., Xu, L.M., Costanzo, C., Cheng, J.Q., and Wang, L.H. (2008). Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3

- and mediates STAT3 oncogenic function. *J Biol Chem* 283, 14665-14673.
- Chiesa, S., Tomasello, E., Vivier, E., and Vely, F. (2005). Coordination of activating and inhibitory signals in natural killer cells. *Mol Immunol* 42, 477-484.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R.A., and Fu, X.Y. (1997). Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 17, 5328-5337.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y., and Fu, X.Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719-722.
- Choudhari, S.R., Khan, M.A., Harris, G., Picker, D., Jacob, G.S., Block, T., and Shailubhai, K. (2007). Deactivation of Akt and STAT3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation, and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to an anticancer agent, Atiprimod. *Mol Cancer Ther* 6, 112-121.
- Choy, M.K., and Phipps, M.E. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med* 16, 97-106.
- Christofori, G., and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24, 73-76.
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.
- Clark, R.H., Stinchcombe, J.C., Day, A., Blott, E., Booth, S., Bossi, G., Hamblin, T., Davies, E.G., and Griffiths, G.M. (2003). Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat Immunol* 4, 1111-1120.
- Classen, C.F., Falk, C.S., Friesen, C., Fulda, S., Herr, I., and Debatin, K.M. (2003). Natural killer resistance of a drug-resistant leukemia cell line, mediated by up-regulation of HLA class I expression. *Haematologica* 88, 509-521.
- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M.A., Vallejo, C., Martos, J.A., and Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79, 2320-2328.
- Coleman, D.R.t., Ren, Z., Mandal, P.K., Cameron, A.G., Dyer, G.A., Muranjan, S., Campbell, M., Chen, X., and McMurray, J.S. (2005). Investigation of the binding determinants of phosphopeptides targeted to the SRC homology 2 domain of the signal transducer and activator of transcription 3. Development of a high-affinity peptide inhibitor. *J Med Chem* 48, 6661-6670.
- Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., and Lopez-Botet, M. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 186, 1809-1818.
- Colonna, M., and Samaridis, J. (1995). Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268, 405-408.
- Colonna, M., Spies, T., Strominger, J.L., Ciccone, E., Moretta, A., Moretta, L., Pende, D., and Viale, O. (1992). Alloantigen recognition by two human natural killer cell clones is associated with HLA-C or a closely linked gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7983-7985.
- Colucci, F., and Di Santo, J.P. (2000). The receptor tyrosine kinase c-kit provides a critical signal for survival, expansion, and maturation of mouse natural killer cells. *Blood* 95, 984-991.
- Colucci, F., Schweighoffer, E., Tomasello, E., Turner, M., Ortaldo, J.R., Vivier, E., Tybulewicz, V.L., and Di Santo, J.P. (2002). Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *Nat Immunol* 3, 288-294.
- Cooper, M.A., Elliott, J.M., Keyel, P.A., Yang, L., Carrero, J.A., and Yokoyama, W.M. (2009). Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1915-1919.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633-640.
- Corvinus, F.M., Orth, C., Moriggl, R., Tsareva, S.A., Wagner, S., Pfitzner, E.B., Baus, D., Kaufmann, R., Huber, L.A., Zatloukal, K., *et al.* (2005). Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia* 7, 545-555.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123-133.

Costello, R.T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.J., Reviron, D., Gastaut, J.A., Pende, D., Olive, D., and Moretta, A. (2002). Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 99, 3661-3667.

Crane, C.A., Han, S.J., Barry, J.J., Ahn, B.J., Lanier, L.L., and Parsa, A.T. TGF- $\beta$  downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells in glioma patients. *Neuro Oncol* 12, 7-13.

Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J., and Smyth, M.J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168, 1356-1361.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10, 942-949.

## D

Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T.P., Henry, S.C., Hamilton, J.D., and Biron, C.A. (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med* 197, 885-898.

Davies, A., Kalb, S., Liang, B., Aldrich, C.J., Lemonnier, F.A., Jiang, H., Cotter, R., and Soloski, M.J. (2003). A peptide from heat shock protein 60 is the dominant peptide bound to Qa-1 in the absence of the MHC class Ia leader sequence peptide Qdm. *J Immunol* 170, 5027-5033.

Degli-Esposti, M.A., and Smyth, M.J. (2005). Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 5, 112-124.

Degrassi, A., Russo, M., Scanziani, E., Giusti, A., Ceruti, R., Texido, G., and Pesenti, E. (2007). Magnetic resonance imaging and histopathological characterization of prostate tumors in TRAMP mice as model for pre-clinical trials. *Prostate* 67, 396-404.

Della Chiesa, M., Vitale, M., Carlomagno, S., Ferlazzo, G., Moretta, L., and Moretta, A. (2003). The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking

inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 33, 1657-1666.

Derniame, S., Vignaud, J.M., Faure, G.C., and Bene, M.C. (2008). Alteration of the immunological synapse in lung cancer: a microenvironmental approach. *Clin Exp Immunol* 154, 48-55.

Detjen, K.M., Farwig, K., Welzel, M., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. (2001). Interferon gamma inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase-1 dependent induction of apoptosis. *Gut* 49, 251-262.

Dhir, R., Ni, Z., Lou, W., DeMiguel, F., Grandis, J.R., and Gao, A.C. (2002). Stat3 activation in prostatic carcinomas. *Prostate* 51, 241-246.

Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S.D., Shastri, N., and Raulet, D.H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1, 119-126.

Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., and Raulet, D.H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413, 165-171.

Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A.M., Hsia, J.K., Vivier, E., and Raulet, D.H. (2002). Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 3, 1142-1149.

Dien, J., Amin, H.M., Chiu, N., Wong, W., Frantz, C., Chiu, B., Mackey, J.R., and Lai, R. (2006). Signal transducers and activators of transcription-3 up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and decreases invasiveness of breast cancer. *Am J Pathol* 169, 633-642.

Dighe, A.S., Farrar, M.A., and Schreiber, R.D. (1993). Inhibition of cellular responsiveness to interferon-gamma (IFN gamma) induced by overexpression of inactive forms of the IFN gamma receptor. *J Biol Chem* 268, 10645-10653.

Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1, 447-456.

DiTullio, R.A., Jr., Mochan, T.A., Venere, M., Bartkova, J., Sehested, M., Bartek, J., and Halazonetis, T.D. (2002). 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nat Cell Biol* 4, 998-1002.

Dohring, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M., and Colonna, M. (1996). A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* *156*, 3098-3101.

Dokun, A.O., Kim, S., Smith, H.R., Kang, H.S., Chu, D.T., and Yokoyama, W.M. (2001). Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* *2*, 951-956.

Douik, H., Ben Chaaben, A., Attia Romdhane, N., Romdhane, H.B., Mamoghli, T., Fortier, C., Boukouaci, W., Harzallah, L., Ghanem, A., Gritli, S., *et al.* (2009). Association of MICA-129 polymorphism with nasopharyngeal cancer risk in a Tunisian population. *Hum Immunol* *70*, 45-48.

Draghi, M., Pashine, A., Sanjanwala, B., Gendzekhadze, K., Cantoni, C., Cosman, D., Moretta, A., Valiante, N.M., and Parham, P. (2007). NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J Immunol* *178*, 2688-2698.

Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2002). IL-15 $\alpha$  recycles and presents IL-15 *In trans* to neighboring cells. *Immunity* *17*, 537-547.

Dunn, C., Chalupny, N.J., Sutherland, C.L., Dosch, S., Sivakumar, P.V., Johnson, D.C., and Cosman, D. (2003). Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* *197*, 1427-1439.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* *3*, 991-998.

Duthie, M.S., and Kahn, S.J. (2005). NK cell activation and protection occur independently of natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Int Immunol* *17*, 607-613.

## E

Egwuagu, C.E. (2009). STAT3 in CD4<sup>+</sup> T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine* *47*, 149-156.

Eisele, G., Wischhusen, J., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Waldhauer, I., Steinle, A., Weller, M., and Friese, M.A. (2006). TGF- $\beta$  and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* *129*, 2416-2425.

Eriksson, M., Leitz, G., Fallman, E., Axner, O., Ryan, J.C., Nakamura, M.C., and Sentman, C.L. (1999). Inhibitory receptors alter natural killer cell interactions with target cells yet allow simultaneous killing of susceptible targets. *J Exp Med* *190*, 1005-1012.

Esin, S., Batoni, G., Counoupas, C., Stringaro, A., Brancatisano, F.L., Colone, M., Maisetta, G., Florio, W., Arancia, G., and Campa, M. (2008). Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun* *76*, 1719-1727.

Etzioni, A., Eidenschenk, C., Katz, R., Beck, R., Casanova, J.L., and Pollack, S. (2005). Fatal varicella associated with selective natural killer cell deficiency. *J Pediatr* *146*, 423-425.

## F

Falasca, M., Logan, S.K., Lehto, V.P., Baccante, G., Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (1998). Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* *17*, 414-422.

Fallarino, F., and Gajewski, T.F. (1999). Cutting edge: differentiation of antitumor CTL *in vivo* requires host expression of Stat1. *J Immunol* *163*, 4109-4113.

Fassett, M.S., Davis, D.M., Valter, M.M., Cohen, G.B., and Strominger, J.L. (2001). Signaling at the inhibitory natural killer cell immune synapse regulates lipid raft polarization but not class I MHC clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 14547-14552.

Faure, M., Barber, D.F., Takahashi, S.M., Jin, T., and Long, E.O. (2003). Spontaneous clustering and tyrosine phosphorylation of NK cell inhibitory receptor induced by ligand binding. *J Immunol* *170*, 6107-6114.

Faure, S., Meyer, L., Costagliola, D., Vaneensberghe, C., Genin, E., Autran, B., Delfraissy, J.F., McDermott, D.H., Murphy, P.M., Debre, P., *et al.* (2000). Rapid progression to AIDS in HIV<sup>+</sup> individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* *287*, 2274-2277.

Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Ljunggren, H.G., Malmberg, K.J., and Michaelsson, J. (2009). Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood*.

- Fausther-Bovendo, H., Sol-Foulon, N., Candotti, D., Agut, H., Schwartz, O., Debre, P., and Vieillard, V. (2009). HIV escape from natural killer cytotoxicity: nef inhibits NKp44L expression on CD4+ T cells. *AIDS* 23, 1077-1087.
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Charadin, M., Chedeville, G., Tamary, H., *et al.* (2003). Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115, 461-473.
- Feng, C.G., Kaviratne, M., Rothfuchs, A.G., Cheever, A., Hieny, S., Young, H.A., Wynn, T.A., and Sher, A. (2006). NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 177, 7086-7093.
- Ferguson, L.R., Han, D.Y., Fraser, A.G., Huebner, C., Lam, W.J., Morgan, A.R., Duan, H., and Karunasinghe, N. Genetic factors in chronic inflammation: Single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population. *Mutat Res*.
- Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L., and Munz, C. (2004a). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16606-16611.
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A., and Munz, C. (2004b). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 172, 1455-1462.
- Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., and Munz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195, 343-351.
- Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., and Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5, 405-411.
- Fernandez, N.C., Treiner, E., Vance, R.E., Jamieson, A.M., Lemieux, S., and Raulet, D.H. (2005). A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 105, 4416-4423.
- Fionda, C., Soriani, A., Malgarini, G., Iannitto, M.L., Santoni, A., and Cippitelli, M. (2009). Heat shock protein-90 inhibitors increase MHC class I-related chain A and B ligand expression on multiple myeloma cells and their ability to trigger NK cell degranulation. *J Immunol* 183, 4385-4394.
- Flores-Villanueva, P.O., Yunis, E.J., Delgado, J.C., Vittinghoff, E., Buchbinder, S., Leung, J.Y., Ugliarolo, A.M., Clavijo, O.P., Rosenberg, E.S., Kalams, S.A., *et al.* (2001). Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5140-5145.
- Fontana, S., Parolini, S., Vermi, W., Booth, S., Gallo, F., Donini, M., Benassi, M., Gentili, F., Ferrari, D., Notarangelo, L.D., *et al.* (2006). Innate immunity defects in Hermansky-Pudlak type 2 syndrome. *Blood* 107, 4857-4864.
- Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T.H., Hedderich, J., May, S., Lu, T., Schuldt, D., Nikolaus, S., Rosenstiel, P., Krawczak, M., and Schreiber, S. (2008). Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet* 40, 713-715.
- Freud, A.G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H.C., Ferketich, A.K., Nuovo, G.J., Hughes, T.L., Marburger, T.B., Sung, J., Baiocchi, R.A., *et al.* (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 22, 295-304.
- Friese, M.A., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A., and Weller, M. (2004). RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 64, 7596-7603.
- Fu, A.K., Fu, W.Y., Ng, A.K., Chien, W.W., Ng, Y.P., Wang, J.H., and Ip, N.Y. (2004). Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6728-6733.
- G**
- Galandrini, R., Palmieri, G., Piccoli, M., Frati, L., and Santoni, A. (1996). CD16-mediated p21ras

activation is associated with Shc and p36 tyrosine phosphorylation and their binding with Grb2 in human natural killer cells. *J Exp Med* *183*, 179-186.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* *313*, 1960-1964.

Gao, N., Jennings, P., and Yuan, D. (2008). Requirements for the natural killer cell-mediated induction of IgG1 and IgG2a expression in B lymphocytes. *Int Immunol* *20*, 645-657.

Garcia, R., Yu, C.L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K.L., Smithgall, T., Fujita, D.J., Ethier, S.P., and Jove, R. (1997). Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* *8*, 1267-1276.

Garg, A., Barnes, P.F., Porgador, A., Roy, S., Wu, S., Nanda, J.S., Griffith, D.E., Girard, W.M., Rawal, N., Shetty, S., and Vankayalapati, R. (2006). Vimentin expressed on Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes is involved in binding to the Nkp46 receptor. *J Immunol* *177*, 6192-6198.

Garni-Wagner, B.A., Purohit, A., Mathew, P.A., Bennett, M., and Kumar, V. (1993). A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* *151*, 60-70.

Gascoyne, D.M., Long, E., Veiga-Fernandes, H., de Boer, J., Williams, O., Seddon, B., Coles, M., Kioussis, D., and Brady, H.J. (2009). The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat Immunol* *10*, 1118-1124.

Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* *436*, 1186-1190.

Gatti, R.A., and Good, R.A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* *28*, 89-98.

Gazit, R., Gruda, R., Elboim, M., Arnon, T.I., Katz, G., Achdout, H., Hanna, J., Qimron, U., Landau, G., Greenbaum, E., *et al.* (2006). Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1. *Nat Immunol* *7*, 517-523.

George, T.C., Ortaldo, J.R., Lemieux, S., Kumar, V., and Bennett, M. (1999). Tolerance and

alloreactivity of the Ly49D subset of murine NK cells. *J Immunol* *163*, 1859-1867.

Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* *195*, 327-333.

Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., and Trinchieri, G. (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* *174*, 727-734.

Ghoreschi, K., Laurence, A., and O'Shea, J.J. (2009). Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: to be or not to be? *Nat Immunol* *10*, 356-360.

Giacinti, C., and Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene* *25*, 5220-5227.

Giebel, S., Locatelli, F., Lamparelli, T., Velardi, A., Davies, S., Frumento, G., Maccario, R., Bonetti, F., Wojnar, J., Martinetti, M., *et al.* (2003). Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* *102*, 814-819.

Gilfillan, S., Ho, E.L., Cella, M., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2002). NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* *3*, 1150-1155.

Gourzi, P., Leonova, T., and Papavasiliou, F.N. (2006). A role for activation-induced cytidine deaminase in the host response against a transforming retrovirus. *Immunity* *24*, 779-786.

Grandis, J.R., Drenning, S.D., Chakraborty, A., Zhou, M.Y., Zeng, Q., Pitt, A.S., and Tweardy, D.J. (1998). Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth *In vitro*. *J Clin Invest* *102*, 1385-1392.

Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., and Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* *220*, 169-182.

Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., and Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* *15*, 103-113.

- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12445-12450.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., and Spies, T. (2001). Costimulation of CD8 $\alpha$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* *2*, 255-260.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H., and Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6879-6884.
- Groh, V., Smythe, K., Dai, Z., and Spies, T. (2006). Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. *Nat Immunol* *7*, 755-762.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* *419*, 734-738.
- Gros, F., Cabillic, F., Toutirais, O., Maux, A.L., Sebti, Y., Amiot, L. (2008). Soluble HLA-G molecules impair natural killer/dendritic cell crosstalk via inhibition of dendritic cells. *Eur J Immunol* *3*, 742-9.
- Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.M., and Raulet, D.H. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* *28*, 571-580.
- Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., and Lopez-Botet, M. (2006). Expansion of CD94/NKG2C<sup>+</sup> NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* *107*, 3624-3631.
- Gumperz, J.E., Barber, L.D., Valiante, N.M., Percival, L., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Parham, P. (1997). Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor. *J Immunol* *158*, 5237-5241.
- Gupta, S., Joshi, K., Wig, J.D., and Arora, S.K. (2007). Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncol* *46*, 792-797.
- Haller, O., and Wigzell, H. (1977). Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent. *J Immunol* *118*, 1503-1506.
- Halloran, P.F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* *351*, 2715-2729.
- Hamerman, J.A., Ogasawara, K., and Lanier, L.L. (2004). Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol* *172*, 2001-2005.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hankey, K.G., Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C., Klassen, D.K., Philosophie, B., Bartlett, S.T., Groh, V., Spies, T., and Mann, D.L. (2002). MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* *73*, 304-306.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., *et al.* (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* *12*, 1065-1074.
- Hansasuta, P., Dong, T., Thananchai, H., Weekes, M., Willberg, C., Aldemir, H., Rowland-Jones, S., and Braud, V.M. (2004). Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol* *34*, 1673-1679.
- Harris, T.J., Grosso, J.F., Yen, H.R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E.L., Getnet, D., Goldberg, M.V., Maris, C.H., *et al.* (2007). Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* *179*, 4313-4317.
- Hatjiharissi, E., Xu, L., Santos, D.D., Hunter, Z.R., Ciccarelli, B.T., Verselis, S., Modica, M., Cao, Y., Manning, R.J., Leleu, X., *et al.* (2007). Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc{gamma}RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* *110*, 2561-2564.
- Hayakawa, Y., and Smyth, M.J. (2006a). CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* *176*, 1517-1524.

- Hayakawa, Y., and Smyth, M.J. (2006b). Innate immune recognition and suppression of tumors. *Adv Cancer Res* 95, 293-322.
- Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., and Nakachi, K. (2006). Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res* 66, 563-570.
- He, Y.W., and Malek, T.R. (1996). Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med* 184, 289-293.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 ( Pt 2), 297-314.
- Held, W., and Raulet, D.H. (1997). Expression of the Ly49A gene in murine natural killer cell clones is predominantly but not exclusively mono-allelic. *Eur J Immunol* 27, 2876-2884.
- Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., and Lavrin, D.H. (1975a). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 16, 230-239.
- Herberman, R.B., Nunn, M.E., and Lavrin, D.H. (1975b). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 16, 216-229.
- Hibbs, M.L., Selvaraj, P., Carpen, O., Springer, T.A., Kuster, H., Jouvin, M.H., and Kinet, J.P. (1989). Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc gamma RIII (CD16). *Science* 246, 1608-1611.
- Hokeness, K.L., Kuziel, W.A., Biron, C.A., and Salazar-Mather, T.P. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *J Immunol* 174, 1549-1556.
- Horvath, C.M., Wen, Z., and Darnell, J.E., Jr. (1995). A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 9, 984-994.
- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F.H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173, 1017-1020.
- Hsu, K.C., Liu, X.R., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R.J., and Dupont, B. (2002). Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 169, 5118-5129.
- Hung, W., and Elliott, B. (2001). Co-operative effect of c-Src tyrosine kinase and Stat3 in activation of hepatocyte growth factor expression in mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 276, 12395-12403.
- Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., and Di Santo, J.P. (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med* 206, 25-34.
- Hurwitz, A.A., Foster, B.A., Kwon, E.D., Truong, T., Choi, E.M., Greenberg, N.M., Burg, M.B., and Allison, J.P. (2000). Combination immunotherapy of primary prostate cancer in a transgenic mouse model using CTLA-4 blockade. *Cancer Res* 60, 2444-2448.
- Huss, W.J., Maddison, L.A., and Greenberg, N.M. (2001). Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future. *Semin Cancer Biol* 11, 245-260.

## I

- Igarashi, H., Gregory, S.C., Yokota, T., Sakaguchi, N., and Kincade, P.W. (2002). Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 17, 117-130.
- Iizuka, K., Chaplin, D.D., Wang, Y., Wu, Q., Pegg, L.E., Yokoyama, W.M., and Fu, Y.X. (1999). Requirement for membrane lymphotoxin in natural killer cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6336-6340.
- Ikawa, T., Kawamoto, H., Wright, L.Y., and Murre, C. (2004). Long-term cultured E2A-deficient hematopoietic progenitor cells are pluripotent. *Immunity* 20, 349-360.
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer

incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356, 1795-1799.

Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C.D., Aitken, K., *et al.* (2001). CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409, 349-354.

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., and Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88, 577-583.

Ito, A., Kataoka, T.R., Kim, D.K., Koma, Y., Lee, Y.M., and Kitamura, Y. (2001). Inhibitory effect on natural killer activity of microphthalmia transcription factor encoded by the mutant mi allele of mice. *Blood* 97, 2075-2083.

Itoh, M., Murata, T., Suzuki, T., Shindoh, M., Nakajima, K., Imai, K., and Yoshida, K. (2006). Requirement of STAT3 activation for maximal collagenase-1 (MMP-1) induction by epidermal growth factor and malignant characteristics in T24 bladder cancer cells. *Oncogene* 25, 1195-1204.

## J

Jain, N., Zhang, T., Kee, W.H., Li, W., and Cao, X. (1999). Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem* 274, 24392-24400.

Jaleco, A.C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., Haury, M., Henrique, D., and Parreira, L. (2001). Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med* 194, 991-1002.

Jamieson, A.M., Diefenbach, A., McMahon, C.W., Xiong, N., Carlyle, J.R., and Raulet, D.H. (2002). The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17, 19-29.

Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Kimura, R., Miyagi, T., Mochizuki, K., Sasaki, Y., and Hayashi, N. (2003). Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer* 104, 354-361.

Johansson, M.H., Bieberich, C., Jay, G., Karre, K., and Hoglund, P. (1997). Natural killer cell tolerance in mice with mosaic expression of major histocompatibility complex class I transgene. *J Exp Med* 186, 353-364.

Johansson, M.H., Bieberich, C., Kase-Sjostrom, A., Yoshioka, T., Hoglund, E., Christy, B.A., Scangos, G., Karre, K., Jay, G., and Hoglund, P. (2000). Differential effects on T cell and NK cell development by tissue-specific expression of H-2D(d) transgene. *Eur J Immunol* 30, 525-533.

Jones, R.K., Bulmer, J.N., and Searle, R.F. (1997). Cytotoxic activity of endometrial granulated lymphocytes during the menstrual cycle in humans. *Biol Reprod* 57, 1217-1222.

Jordanova, E.S., Gorter, A., Ayachi, O., Prins, F., Durrant, L.G., Kenter, G.G., van der Burg, S.H., and Fleuren, G.J. (2008). Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin Cancer Res* 14, 2028-2035.

Jumnainsong, A., Romphruk, A.V., Jearanaikoon, P., Klumkrathok, K., Romphruk, A., Luanrattanakorn, S., and Leelayuwat, C. (2007). Association of polymorphic extracellular domains of MICA with cervical cancer in northeastern Thai population. *Tissue Antigens* 69, 326-333.

Junqueira-Kipnis, A.P., Kipnis, A., Jamieson, A., Juarrero, M.G., Diefenbach, A., Raulet, D.H., Turner, J., and Orme, I.M. (2003). NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol* 171, 6039-6045.

## K

Kabat, J., Borrego, F., Brooks, A., and Coligan, J.E. (2002). Role that each NKG2A immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif plays in mediating the human CD94/NKG2A inhibitory signal. *J Immunol* 169, 1948-1958.

Kacha, A.K., Fallarino, F., Markiewicz, M.A., and Gajewski, T.F. (2000). Cutting edge: spontaneous rejection of poorly immunogenic P1.HTR tumors by Stat6-deficient mice. *J Immunol* 165, 6024-6028.

Kaisho, T., Tsutsui, H., Tanaka, T., Tsujimura, T., Takeda, K., Kawai, T., Yoshida, N., Nakanishi, K., and Akira, S. (1999). Impairment of natural killer cytotoxic activity and interferon gamma production in CCAAT/enhancer binding protein gamma-deficient mice. *J Exp Med* 190, 1573-1582.

Kamizono, S., Duncan, G.S., Seidel, M.G., Morimoto, A., Hamada, K., Grosveld, G., Akashi, K., Lind, E.F., Haight, J.P., Ohashi, P.S., *et al.* (2009). Nfil3/E4bp4 is required for the

- development and maturation of NK cells in vivo. *J Exp Med* 206, 2977-2986.
- Kanakaraj, P., Duckworth, B., Azzoni, L., Kamoun, M., Cantley, L.C., and Perussia, B. (1994). Phosphatidylinositol-3 kinase activation induced upon Fc gamma RIIIA-ligand interaction. *J Exp Med* 179, 551-558.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7556-7561.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678.
- Kase, A., Johansson, M.H., Olsson-Alheim, M.Y., Karre, K., and Hoglund, P. (1998). External and internal calibration of the MHC class I-specific receptor Ly49A on murine natural killer cells. *J Immunol* 161, 6133-6138.
- Kashii, Y., Giorda, R., Herberman, R.B., Whiteside, T.L., and Vujanovic, N.L. (1999). Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol* 163, 5358-5366.
- Kataoka, K., Kim, D.J., Carbajal, S., Clifford, J.L., and DiGiovanni, J. (2008). Stage-specific disruption of Stat3 demonstrates a direct requirement during both the initiation and promotion stages of mouse skin tumorigenesis. *Carcinogenesis* 29, 1108-1114.
- Katz, G., Markel, G., Mizrahi, S., Arnon, T.I., and Mandelboim, O. (2001). Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4. *J Immunol* 166, 7260-7267.
- Kawamura, T., Koka, R., Ma, A., and Kumar, V. (2003). Differential roles for IL-15R alpha-chain in NK cell development and Ly-49 induction. *J Immunol* 171, 5085-5090.
- Keane, M.P., Arenberg, D.A., Lynch, J.P., 3rd, Whyte, R.I., Iannettoni, M.D., Burdick, M.D., Wilke, C.A., Morris, S.B., Glass, M.C., DiGiovine, B., *et al.* (1997). The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 159, 1437-1443.
- Keskin, D.B., Allan, D.S., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Stern, J.N., Kopcow, H.D., Koopman, L.A., and Strominger, J.L. (2007). TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3378-3383.
- Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J.J., Vlahov, D., Hilgartner, M., *et al.* (2004). HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305, 872-874.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975a). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5, 117-121.
- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975b). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5, 112-117.
- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H.L., Weissman, I.L., and Yokoyama, W.M. (2000). In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2731-2736.
- Kim, S., Iizuka, K., Kang, H.S., Dokun, A., French, A.R., Greco, S., and Yokoyama, W.M. (2002). In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* 3, 523-528.
- Kinjyo, I., Inoue, H., Hamano, S., Fukuyama, S., Yoshimura, T., Koga, K., Takaki, H., Himeno, K., Takaesu, G., Kobayashi, T., and Yoshimura, A. (2006). Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp Med* 203, 1021-1031.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Kirsten, H., Petit-Teixeira, E., Scholz, M., Hasenclever, D., Hantmann, H., Heider, D., Wagner, U., Sack, U., Hugo Teixeira, V., Prum, B., *et al.* (2009). Association of MICA with rheumatoid arthritis independent of known HLA-DRB1 risk alleles in a family-based and a case control study. *Arthritis Res Ther* 11, R60.
- Kitaya, K. (2008). Accumulation of uterine CD16(-) natural killer (NK) cells: friends, foes, or Jekyll-and-Hyde relationship for the conceptus? *Immunol Invest* 37, 467-481.
- Kitaya, K., Yasuda, J., Yagi, I., Tada, Y., Fushiki, S., and Honjo, H. (2000). IL-15 expression at

- human endometrium and decidua. *Biol Reprod* 63, 683-687.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903-907.
- Koka, R., Burkett, P.R., Chien, M., Chai, S., Chan, F., Lodolce, J.P., Boone, D.L., and Ma, A. (2003). Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice. *J Exp Med* 197, 977-984.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Koopman, L.A., Corver, W.E., van der Slik, A.R., Giphart, M.J., and Fleuren, G.J. (2000). Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 191, 961-976.
- Koopman, L.A., Kopcow, H.D., Rybalov, B., Boyson, J.E., Orange, J.S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C.J., Schachter, A.D., Park, P.J., and Strominger, J.L. (2003). Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 198, 1201-1212.
- Koopman, L.A., van Der Slik, A.R., Giphart, M.J., and Fleuren, G.J. (1999). Human leukocyte antigen class I gene mutations in cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 1669-1677.
- Kopp, H.G., Placke, T., and Salih, H.R. (2009). Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res* 69, 7775-7783.
- Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H., Mule, J., Kerr, W.G., *et al.* (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 11, 1314-1321.
- Kortylewski, M., Swiderski, P., Herrmann, A., Wang, L., Kowolik, C., Kujawski, M., Lee, H., Scuto, A., Liu, Y., Yang, C., *et al.* (2009a). In vivo delivery of siRNA to immune cells by conjugation to a TLR9 agonist enhances antitumor immune responses. *Nat Biotechnol* 27, 925-932.
- Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y., Harris, T., Drake, C., Pardoll, D., and Yu, H. (2009b). Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 15, 114-123.
- Kotha, A., Sekharam, M., Cilenti, L., Siddiquee, K., Khaled, A., Zervos, A.S., Carter, B., Turkson, J., and Jove, R. (2006). Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Mol Cancer Ther* 5, 621-629.
- Krmpotic, A., Busch, D.H., Bubic, I., Gebhardt, F., Hengel, H., Hasan, M., Scalzo, A.A., Koszinowski, U.H., and Jonjic, S. (2002). MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 529-535.
- Krzewski, K., Chen, X., Orange, J.S., and Strominger, J.L. (2006). Formation of a WIP-, WASp-, actin-, and myosin IIA-containing multiprotein complex in activated NK cells and its alteration by KIR inhibitory signaling. *J Cell Biol* 173, 121-132.
- Krzewski, K., Chen, X., and Strominger, J.L. (2008). WIP is essential for lytic granule polarization and NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2568-2573.
- Kubota, A., Kubota, S., Lohwasser, S., Mager, D.L., and Takei, F. (1999). Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice. *J Immunol* 163, 212-216.
- Kujawski, M., Kortylewski, M., Lee, H., Herrmann, A., Kay, H., and Yu, H. (2008). Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 118, 3367-3377.
- Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., and Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 770-774.
- Kuribara, R., Kinoshita, T., Miyajima, A., Shinjyo, T., Yoshihara, T., Inukai, T., Ozawa, K., Look, A.T., and Inaba, T. (1999). Two distinct interleukin-3-mediated signal pathways, Ras-NFIL3 (E4BP4) and Bcl-xL, regulate the survival of murine pro-B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 19, 2754-2762.
- Kurosaki, T., Gander, I., and Ravetch, J.V. (1991). A subunit common to an IgG Fc receptor and the T-cell receptor mediates assembly through different interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3837-3841.

Kusaba, T., Nakayama, T., Yamazumi, K., Yakata, Y., Yoshizaki, A., Inoue, K., Nagayasu, T., and Sekine, I. (2006). Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep* 15, 1445-1451.

Kwon, E.D., Foster, B.A., Hurwitz, A.A., Madias, C., Allison, J.P., Greenberg, N.M., and Burg, M.B. (1999). Elimination of residual metastatic prostate cancer after surgery and adjunctive cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15074-15079.

Kwon, E.D., Hurwitz, A.A., Foster, B.A., Madias, C., Feldhaus, A.L., Greenberg, N.M., Burg, M.B., and Allison, J.P. (1997). Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8099-8103.

## L

Lacorazza, H.D., Miyazaki, Y., Di Cristofano, A., Deblasio, A., Hedvat, C., Zhang, J., Cordon-Cardo, C., Mao, S., Pandolfi, P.P., and Nimer, S.D. (2002). The ETS protein MEF plays a critical role in perforin gene expression and the development of natural killer and NK-T cells. *Immunity* 17, 437-449.

Lanier, L.L. (2005). NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23, 225-274.

Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9, 495-502.

Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J., and Phillips, J.H. (1998a). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 8, 693-701.

Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C., and Phillips, J.H. (1998b). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391, 703-707.

Lanier, L.L., Yu, G., and Phillips, J.H. (1989). Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342, 803-805.

Laouar, Y., Sutterwala, F.S., Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2005). Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* 6, 600-607.

Larmonier, N., Janikashvili, N., LaCasse, C.J., Larmonier, C.B., Cantrell, J., Situ, E., Lundeen, T., Bonnotte, B., and Katsanis, E. (2008). Imatinib mesylate inhibits CD4+ CD25+ regulatory T cell activity and enhances active immunotherapy against BCR-ABL- tumors. *J Immunol* 181, 6955-6963.

Lauzon, N.M., Mian, F., MacKenzie, R., and Ashkar, A.A. (2006). The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* 241, 102-112.

Le Drian, E., Vely, F., Olcese, L., Cambiaggi, A., Guia, S., Krystal, G., Gervois, N., Moretta, A., Jotereau, F., and Vivier, E. (1998). Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* 28, 264-276.

Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734-1736.

Lee, J., Kang, W.K., Park, J.O., Park, S.H., Park, Y.S., Lim, H.Y., Kim, J., Kong, J., Choi, M.G., Sohn, T.S., *et al.* (2009). Expression of activated signal transducer and activator of transcription 3 predicts poor clinical outcome in gastric adenocarcinoma. *APMIS* 117, 598-606.

Lee, J.C., Lee, K.M., Kim, D.W., and Heo, D.S. (2004). Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol* 172, 7335-7340.

Lee, K.N., Kang, H.S., Jeon, J.H., Kim, E.M., Yoon, S.R., Song, H., Lyu, C.Y., Piao, Z.H., Kim, S.U., Han, Y.H., *et al.* (2005). VDUP1 is required for the development of natural killer cells. *Immunity* 22, 195-208.

Lenac, T., Budt, M., Arapovic, J., Hasan, M., Zimmermann, A., Simic, H., Krmpotic, A., Messerle, M., Ruzsics, Z., Koszinowski, U.H., *et al.* (2006). The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *J Exp Med* 203, 1843-1850.

Leong, P.L., Andrews, G.A., Johnson, D.E., Dyer, K.F., Xi, S., Mai, J.C., Robbins, P.D., Gadiparthi, S., Burke, N.A., Watkins, S.F., and Grandis, J.R. (2003). Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4138-4143.

- Li, C., Ge, B., Nicotra, M., Stern, J.N., Kopcow, H.D., Chen, X., and Strominger, J.L. (2008). JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3017-3022.
- Li, K., Mandai, M., Hamanishi, J., Matsumura, N., Suzuki, A., Yagi, H., Yamaguchi, K., Baba, T., Fujii, S., and Konishi, I. (2009). Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis. *Cancer Immunol Immunother* 58, 641-652.
- Li, P., Morris, D.L., Willcox, B.E., Steinle, A., Spies, T., and Strong, R.K. (2001). Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2, 443-451.
- Li, W.C., Ye, S.L., Sun, R.X., Liu, Y.K., Tang, Z.Y., Kim, Y., Karras, J.G., and Zhang, H. (2006). Inhibition of growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by antisense oligonucleotide targeting signal transducer and activator of transcription 3. *Clin Cancer Res* 12, 7140-7148.
- Li, Y., de Haar, C., Chen, M., Deuring, J., Gerrits, M.M., Smits, R., Xia, B., Kuipers, E.J., and van der Woude, C.J. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut* 59, 227-235.
- Liao, N.S., Bix, M., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Raulet, D. (1991). MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 253, 199-202.
- Liese, J., Schleicher, U., and Bogdan, C. (2008). The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* 213, 377-387.
- Lin, J., Buettner, R., Yuan, Y.C., Yip, R., Horne, D., Jove, R., and Vaidehi, N. (2009). Molecular dynamics simulations of the conformational changes in signal transducers and activators of transcription, Stat1 and Stat3. *J Mol Graph Model* 28, 347-356.
- Ling, X., and Arlinghaus, R.B. (2005). Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. *Cancer Res* 65, 2532-2536.
- Litonjua, A.A., Tantisira, K.G., Lake, S., Lazarus, R., Richter, B.G., Gabriel, S., Silverman, E.S., and Weiss, S.T. (2005). Polymorphisms in signal transducer and activator of transcription 3 and lung function in asthma. *Respir Res* 6, 52.
- Liu, C., Lou, Y., Lizee, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., Kim, G.J., Wang, Y.H., Ye, Y., Sikora, A.G., *et al.* (2008). Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J Clin Invest* 118, 1165-1175.
- Liu, D., Xu, L., Yang, F., Li, D., Gong, F., and Xu, T. (2005). Rapid biogenesis and sensitization of secretory lysosomes in NK cells mediated by target-cell recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 123-127.
- Lodoen, M., Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Arase, H., Houchins, J.P., Mocarski, E.S., and Lanier, L.L. (2003). NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med* 197, 1245-1253.
- Lodoen, M.B., Abenes, G., Umamoto, S., Houchins, J.P., Liu, F., and Lanier, L.L. (2004). The cytomegalovirus m155 gene product subverts natural killer cell antiviral protection by disruption of H60-NKG2D interactions. *J Exp Med* 200, 1075-1081.
- Lodoen, M.B., and Lanier, L.L. (2005). Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol* 3, 59-69.
- Lou, Z., Jevremovic, D., Billadeau, D.D., and Leibson, P.J. (2000). A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J Exp Med* 191, 347-354.
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26, 503-517.

## M

Ma, Y., Yang, H., Qi, J., Liu, D., Xiong, P., Xu, Y., Feng, W., Zheng, G., Li, P., Fang, M., *et al.* (2009). CD2AP is indispensable to multistep cytotoxic process by NK cells. *Mol Immunol*.

Madjd, Z., Spendlove, I., Moss, R., Bevin, S., Pinder, S.E., Watson, N.F., Ellis, I., and Durrant, L.G. (2007). Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. *Cancer Immunol* 7, 17.

- Mahboubi, K., Li, F., Plescia, J., Kirkiles-Smith, N.C., Mesri, M., Du, Y., Carroll, J.M., Elias, J.A., Altieri, D.C., and Pober, J.S. (2001). Interleukin-11 up-regulates survivin expression in endothelial cells through a signal transducer and activator of transcription-3 pathway. *Lab Invest* 81, 327-334.
- Mahnke, K., Schonfeld, K., Fondel, S., Ring, S., Karakhanova, S., Wiedemeyer, K., Bedke, T., Johnson, T.S., Storn, V., Schallenberg, S., and Enk, A.H. (2007). Depletion of CD4+CD25+ human regulatory T cells in vivo: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro. *Int J Cancer* 120, 2723-2733.
- Mailliard, R.B., Son, Y.I., Redlinger, R., Coates, P.T., Giermasz, A., Morel, P.A., Storkus, W.J., and Kalinski, P. (2003). Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 171, 2366-2373.
- Maker, A.V., Attia, P., and Rosenberg, S.A. (2005a). Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 175, 7746-7754.
- Maker, A.V., Phan, G.Q., Attia, P., Yang, J.C., Sherry, R.M., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Royal, R.E., Haworth, L.R., Levy, C., *et al.* (2005b). Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* 12, 1005-1016.
- Maleno, I., Cabrera, C.M., Cabrera, T., Paco, L., Lopez-Nevot, M.A., Collado, A., Ferron, A., and Garrido, F. (2004). Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 56, 244-253.
- Mami-Chouaib, F., Echchakir, H., Dorothee, G., Vergnon, I., and Chouaib, S. (2002). Antitumor cytotoxic T-lymphocyte response in human lung carcinoma: identification of a tumor-associated antigen. *Immunol Rev* 188, 114-121.
- Manaster, I., Mizrahi, S., Goldman-Wohl, D., Sela, H.Y., Stern-Ginossar, N., Lankry, D., Gruda, R., Hurwitz, A., Bdolah, Y., Haimov-Kochman, R., *et al.* (2008). Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol* 181, 1869-1876.
- Mandal, P.K., Limbrick, D., Coleman, D.R., Dyer, G.A., Ren, Z., Birtwistle, J.S., Xiong, C., Chen, X., Briggs, J.M., and McMurray, J.S. (2009). Conformationally constrained peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription. 3: Evaluation and molecular modeling. *J Med Chem* 52, 2429-2442.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055-1060.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- Marcenaro, S., Gallo, F., Martini, S., Santoro, A., Griffiths, G.M., Arico, M., Moretta, L., and Pende, D. (2006). Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease. *Blood* 108, 2316-2323.
- Marcet-Palacios, M., Odemuyiwa, S.O., Coughlin, J.J., Garofoli, D., Ewen, C., Davidson, C.E., Ghaffari, M., Kane, K.P., Lacy, P., Logan, M.R., *et al.* (2008). Vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP-7) is essential for target cell killing in a natural killer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 617-623.
- Maritano, D., Sugrue, M.L., Tininini, S., Dewilde, S., Strobl, B., Fu, X., Murray-Tait, V., Chiarle, R., and Poli, V. (2004). The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol* 5, 401-409.
- Martin, M.P., Nelson, G., Lee, J.H., Pellett, F., Gao, X., Wade, J., Wilson, M.J., Trowsdale, J., Gladman, D., and Carrington, M. (2002). Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 169, 2818-2822.
- Martin, M.P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J.N., Pereyra, F., Colombo, S., Brown, E.E., Shupert, W.L., Phair, J., *et al.* (2007). Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 39, 733-740.
- Masilamani, M., Nguyen, C., Kabat, J., Borrego, F., and Coligan, J.E. (2006). CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network

- at the immunological synapse. *J Immunol* 177, 3590-3596.
- Masuda, M., Suzui, M., Yasumatu, R., Nakashima, T., Kuratomi, Y., Azuma, K., Tomita, K., Komiyama, S., and Weinstein, I.B. (2002). Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62, 3351-3355.
- McGivary, R.W., Eagle, R.A., Rolland, P., Jafferji, I., Trowsdale, J., and Durrant, L.G. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. *Int J Cancer*.
- Megenev, L.A., Perry, R.L., LeCouter, J.E., and Rudnicki, M.A. (1996). bFGF and LIF signaling activates STAT3 in proliferating myoblasts. *Dev Genet* 19, 139-145.
- Mehta, I.K., Wang, J., Roland, J., Margulies, D.H., and Yokoyama, W.M. (2001). Ly49A allelic variation and MHC class I specificity. *Immunogenetics* 53, 572-583.
- Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., and de Saint Basile, G. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 25, 173-176.
- Menon, A.G., Janssen-van Rhijn, C.M., Morreau, H., Putter, H., Tollenaar, R.A., van de Velde, C.J., Fleuren, G.J., and Kuppen, P.J. (2004). Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 84, 493-501.
- Michaelsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L.L., Karre, K., and Soderstrom, K. (2002). A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med* 196, 1403-1414.
- Migone, T.S., Cacalano, N.A., Taylor, N., Yi, T., Waldmann, T.A., and Johnston, J.A. (1998). Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3845-3850.
- Migone, T.S., Lin, J.X., Cereseto, A., Mulloy, J.C., O'Shea, J.J., Franchini, G., and Leonard, W.J. (1995). Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science* 269, 79-81.
- Miller, J.D., Weber, D.A., Ibegbu, C., Pohl, J., Altman, J.D., and Jensen, P.E. (2003). Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide required for recognition by CD94/NKG2. *J Immunol* 171, 1369-1375.
- Mocikat, R., Braumuller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmuller, G., *et al.* (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19, 561-569.
- Moingeon, P., Lucich, J.L., McConkey, D.J., Letourneur, F., Malissen, B., Kochan, J., Chang, H.C., Rodewald, H.R., and Reinherz, E.L. (1992). CD3 zeta dependence of the CD2 pathway of activation in T lymphocytes and natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1492-1496.
- Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gomez-Mouton, C., Lanzavecchia, A., Martinez, A.C., Manes, S., and Viola, A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6, 465-471.
- Morel, P.A., Ernst, L.K., and Metes, D. (1999). Functional CD32 molecules on human NK cells. *Leuk Lymphoma* 35, 47-56.
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2000). Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 21, 228-234.
- Moretta, A., Bottino, C., Tripodi, G., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E., Millo, R., and *et al.* (1992). Novel surface molecules involved in human NK cell activation and triggering of the lytic machinery. *Int J Cancer Suppl* 7, 6-10.
- Morgan, W.D. (1989). Transcription factor Sp1 binds to and activates a human hsp70 gene promoter. *Mol Cell Biol* 9, 4099-4104.
- Moriyama, I., Ishihara, S., Rumi, M.A., Aziz, M.D., Mishima, Y., Oshima, N., Kadota, C., Kadowaki, Y., Amano, Y., and Kinoshita, Y. (2008). Decoy oligodeoxynucleotide targeting activator protein-1 (AP-1) attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis. *Lab Invest* 88, 652-663.
- Mrozek, E., Anderson, P., and Caligiuri, M.A. (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87, 2632-2640.
- Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). IL-6-induced

homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260, 1808-1810.

Mus, A.M., Cornelissen, F., Asmawidjaja, P.S., van Hamburg, J.P., Boon, L., Hendriks, R.W., and Lubberts, E. IL-23 promotes Th17 differentiation by inhibiting T-bet and FoxP3 and is required for IL-22 but not IL-21 in autoimmune experimental arthritis. *Arthritis Rheum*.

Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sanchez, M., Nussenzweig, M.C., and Ravetch, J.V. (1994). A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* 369, 340.

## N

Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, S., and Phillips, J.H. (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143, 3183-3191.

Nakajima, H., Cella, M., Bouchon, A., Grierson, H.L., Lewis, J., Duckett, C.S., Cohen, J.I., and Colonna, M. (2000). Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity. *Eur J Immunol* 30, 3309-3318.

Nam, S., Buettner, R., Turkson, J., Kim, D., Cheng, J.Q., Muehlbeyer, S., Hippe, F., Vatter, S., Merz, K.H., Eisenbrand, G., and Jove, R. (2005). Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5998-6003.

Navarro, F., Llano, M., Bellon, T., Colonna, M., Geraghty, D.E., and Lopez-Botet, M. (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 29, 277-283.

Nedvetzki, S., Sowinski, S., Eagle, R.A., Harris, J., Vely, F., Pende, D., Trowsdale, J., Vivier, E., Gordon, S., and Davis, D.M. (2007). Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 109, 3776-3785.

Nishihori, Y., Kato, K., Tanaka, M., Okamoto, T., Hagiwara, S., Araki, N., Kogawa, K., Kuribayashi, K., Nakamura, K., and Niitsu, Y. (2009). Interleukin-2 gene transfer potentiates the alpha-galactosylceramide-stimulated antitumor effect by the induction of TRAIL in NKT and NK cells in mouse models of subcutaneous and metastatic carcinoma. *Cancer Biol Ther* 8, 1763-1770.

Niu, G., Bowman, T., Huang, M., Shivers, S., Reintgen, D., Daud, A., Chang, A., Kraker, A., Jove, R., and Yu, H. (2002a). Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene* 21, 7001-7010.

Niu, G., Wright, K.L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., *et al.* (2002b). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21, 2000-2008.

## O

Ochs, H.D., and Thrasher, A.J. (2006). The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 117, 725-738; quiz 739.

Olcaydu, D., Harutyunyan, A., Jager, R., Berg, T., Gisslinger, B., Pabinger, I., Gisslinger, H., and Kralovics, R. (2009). A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 41, 450-454.

Olcese, L., Cambiaggi, A., Semenzato, G., Bottino, C., Moretta, A., and Vivier, E. (1997). Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *J Immunol* 158, 5083-5086.

Olivier, A., Lauret, E., Gonin, P., and Galy, A. (2006). The Notch ligand delta-1 is a hematopoietic development cofactor for plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 107, 2694-2701.

Onfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K., and Davis, D.M. (2004). Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* 173, 1511-1513.

Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59, 3128-3133.

Oppenheim, D.E., Roberts, S.J., Clarke, S.L., Filler, R., Lewis, J.M., Tigelaar, R.E., Girardi, M., and Hayday, A.C. (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* 6, 928-937.

Orange, J.S., and Ballas, Z.K. (2006). Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 118, 1-10.

Orange, J.S., and Biron, C.A. (1996a). An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. *Studies of natural killer and T cell responses in*

contrasting viral infections. *J Immunol* 156, 1138-1142.

Orange, J.S., and Biron, C.A. (1996b). Characterization of early IL-12, IFN- $\alpha$ , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 156, 4746-4756.

Orange, J.S., Harris, K.E., Andzelm, M.M., Valter, M.M., Geha, R.S., and Strominger, J.L. (2003). The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14151-14156.

Orange, J.S., Ramesh, N., Remold-O'Donnell, E., Sasahara, Y., Koopman, L., Byrne, M., Bonilla, F.A., Rosen, F.S., Geha, R.S., and Strominger, J.L. (2002). Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11351-11356.

Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182, 4499-4506.

## P

Pallandre, J.R., Brillard, E., Crehange, G., Radlovic, A., Remy-Martin, J.P., Saas, P., Rohrllich, P.S., Pivot, X., Ling, X., Tiberghien, P., and Borg, C. (2007). Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol* 179, 7593-7604.

Pallandre, J.R., Krzewski, K., Bedel, R., Ryffel, B., Caignard, A., Rohrllich, P.S., Pivot, X., Tiberghien, P., Zitvogel, L., Strominger, J.L., and Borg, C. (2008). Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation. *Blood* 112, 4420-4424.

Palmieri, G., Tullio, V., Zingoni, A., Piccoli, M., Frati, L., Lopez-Botet, M., and Santoni, A. (1999). CD94/NKG2-A inhibitory complex blocks CD16-triggered Syk and extracellular regulated kinase activation, leading to cytotoxic function of human NK cells. *J Immunol* 162, 7181-7188.

Pappworth, I.Y., Wang, E.C., and Rowe, M. (2007). The switch from latent to productive infection in Epstein-Barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *J Virol* 81, 474-482.

Parihar, R., Trotta, R., Roda, J.M., Ferketich, A.K., Tridandapani, S., Caligiuri, M.A., and Carson,

W.E., 3rd (2005). Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase 1 negatively regulates IFN- $\gamma$  production by natural killer cells stimulated with antibody-coated tumor cells and interleukin-12. *Cancer Res* 65, 9099-9107.

Park, S.J., Nakagawa, T., Kitamura, H., Atsumi, T., Kamon, H., Sawa, S., Kamimura, D., Ueda, N., Iwakura, Y., Ishihara, K., *et al.* (2004). IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 173, 3844-3854.

Parolini, S., Bottino, C., Falco, M., Augugliaro, R., Giliani, S., Franceschini, R., Ochs, H.D., Wolf, H., Bonnefoy, J.Y., Biassoni, R., *et al.* (2000). X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med* 192, 337-346.

Parrini, M.C., Lei, M., Harrison, S.C., and Mayer, B.J. (2002). Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell* 9, 73-83.

Paul, W.E. What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo? *Immunol Cell Biol* 88, 236-239.

Pecqueux, J.C., Schwarz, A., Dieckmann, K.P., and Offermann, G. (1990). Cancer incidence in patients on chronic dialysis and in renal transplant recipients. *Urol Int* 45, 290-292.

Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Dondero, A., Lazzeri, E., Lasagni, L., Martini, S., Rivera, P., *et al.* (2006). Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 107, 2030-2036.

Pende, D., Marcenaro, S., Falco, M., Martini, S., Bernardo, M.E., Montagna, D., Romeo, E., Cognet, C., Martinetti, M., Maccario, R., *et al.* (2009). Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* 113, 3119-3129.

Penn, I. (1995). Sarcomas in organ allograft recipients. *Transplantation* 60, 1485-1491.

Perez, O.D., Mitchell, D., Jager, G.C., and Nolan, G.P. (2004). LFA-1 signaling through p44/42 is coupled to perforin degranulation in CD56+CD8+ natural killer cells. *Blood* 104, 1083-1093.

Petersdorf, E.W., Shuler, K.B., Longton, G.M., Spies, T., and Hansen, J.A. (1999). Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* *49*, 605-612.

Pfützner, E., Kliem, S., Baus, D., and Litterst, C.M. (2004). The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* *10*, 2839-2850.

Phan, G.Q., Yang, J.C., Sherry, R.M., Hwu, P., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Restifo, N.P., Haworth, L.R., Seipp, C.A., Freezer, L.J., *et al.* (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8372-8377.

Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N.M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* *195*, 335-341.

Powell, D.J., Jr., Felipe-Silva, A., Merino, M.J., Ahmadzadeh, M., Allen, T., Levy, C., White, D.E., Mavroukakis, S., Kreitman, R.J., Rosenberg, S.A., and Pastan, I. (2007). Administration of a CD25-directed immunotoxin, LMB-2, to patients with metastatic melanoma induces a selective partial reduction in regulatory T cells in vivo. *J Immunol* *179*, 4919-4928.

## Q

Quinnan, G.V., and Manischewitz, J.E. (1979). The role of natural killer cells and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* *150*, 1549-1554.

## R

Radaev, S., Rostro, B., Brooks, A.G., Colonna, M., and Sun, P.D. (2001). Conformational plasticity revealed by the cocrystal structure of NKG2D and its class I MHC-like ligand ULBP3. *Immunity* *15*, 1039-1049.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* *10*, 547-558.

Ranson, T., Vosshenrich, C.A., Corcuff, E., Richard, O., Muller, W., and Di Santo, J.P. (2003). IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* *101*, 4887-4893.

Raulet, D.H., Vance, R.E., and McMahon, C.W. (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* *19*, 291-330.

Rawlings, J.S., Rosler, K.M., and Harrison, D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* *117*, 1281-1283.

Rebouissou, S., Amessou, M., Couchy, G., Poussin, K., Imbeaud, S., Pilati, C., Izard, T., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., and Zucman-Rossi, J. (2009). Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* *457*, 200-204.

Ribas, A., Camacho, L.H., Lopez-Berestein, G., Pavlov, D., Bulanagui, C.A., Millham, R., Comin-Anduix, B., Reuben, J.M., Seja, E., Parker, C.A., *et al.* (2005). Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol* *23*, 8968-8977.

Riteau, B., Barber, D.F., and Long, E.O. (2003). Vav1 phosphorylation is induced by beta2 integrin engagement on natural killer cells upstream of actin cytoskeleton and lipid raft reorganization. *J Exp Med* *198*, 469-474.

Robbins, S.H., Bessou, G., Cornillon, A., Zucchini, N., Rupp, B., Ruzsics, Z., Sacher, T., Tomasello, E., Vivier, E., Koszinowski, U.H., and Dalod, M. (2007). Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog* *3*, e123.

Roberts, A.I., Lee, L., Schwarz, E., Groh, V., Spies, T., Ebert, E.C., and Jabri, B. (2001). NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol* *167*, 5527-5530.

Roland, J., Soulard, V., Sellier, C., Drapier, A.M., Di Santo, J.P., Cazenave, P.A., and Pied, S. (2006). NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development. *J Immunol* *177*, 1229-1239.

Romero, J.M., Jimenez, P., Cabrera, T., Cozar, J.M., Pedrinaci, S., Tallada, M., Garrido, F., and Ruiz-Cabello, F. (2005). Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/beta2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *Int J Cancer* *113*, 605-610.

Rosen, D.B., Araki, M., Hamerman, J.A., Chen, T., Yamamura, T., and Lanier, L.L. (2004). A Structural basis for the association of DAP12 with

mouse, but not human, NKG2D. *J Immunol* 173, 2470-2478.

Rosen, D.G., Mercado-Urbe, I., Yang, G., Bast, R.C., Jr., Amin, H.M., Lai, R., and Liu, J. (2006). The role of constitutively active signal transducer and activator of transcription 3 in ovarian tumorigenesis and prognosis. *Cancer* 107, 2730-2740.

Rosmaraki, E.E., Douagi, I., Roth, C., Colucci, F., Cumano, A., and Di Santo, J.P. (2001). Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol* 31, 1900-1909.

Rothenberg, E.V., and Taghon, T. (2005). Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol* 23, 601-649.

Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Ferrone, S., and Carosella, E.D. (2005). HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res* 65, 10139-10144.

Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., Jr., *et al.* (2008). Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28, 546-558.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., *et al.* (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097-2100.

Rydlova, M., Holubec, L., Jr., Ludvikova, M., Jr., Kalfert, D., Franekova, J., Povysil, C., and Ludvikova, M. (2008). Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. *Anticancer Res* 28, 1389-1397.

Ryschich, E., Cebotari, O., Fabian, O.V., Autschbach, F., Kleeff, J., Friess, H., Bierhaus, A., Buchler, M.W., and Schmidt, J. (2004). Loss of heterozygosity in the HLA class I region in human pancreatic cancer. *Tissue Antigens* 64, 696-702.

## S

Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., and Yamaguchi, T. (2009). Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21, 1105-1111.

Salazar-Mather, T.P., Orange, J.S., and Biron, C.A. (1998). Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell

inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J Exp Med* 187, 1-14.

Saleh, A., Davies, G.E., Pascal, V., Wright, P.W., Hodge, D.L., Cho, E.H., Lockett, S.J., Abshari, M., and Anderson, S.K. (2004). Identification of probabilistic transcriptional switches in the Ly49 gene cluster: a eukaryotic mechanism for selective gene activation. *Immunity* 21, 55-66.

Salih, H.R., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169, 4098-4102.

Samson, S.I., Richard, O., Tavian, M., Ranson, T., Vosshenrich, C.A., Colucci, F., Buer, J., Grosveld, F., Godin, I., and Di Santo, J.P. (2003). GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* 19, 701-711.

Sandel, M.H., Speetjens, F.M., Menon, A.G., Albertsson, P.A., Basse, P.H., Hokland, M., Nagelkerke, J.F., Tollenaar, R.A., van de Velde, C.J., and Kuppen, P.J. (2005). Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol Immunol* 42, 541-546.

Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M., and Takabayashi, A. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98, 1089-1099.

Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., *et al.* (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18538-18543.

Scadden, D.T. (2003). AIDS-related malignancies. *Annu Rev Med* 54, 285-303.

Scanlan, M.J., Gure, A.O., Jungbluth, A.A., Old, L.J., and Chen, Y.T. (2002). Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188, 22-32.

Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhof, D., Kerr, I.M., and Heinrich, P.C. (1998). Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 335 ( Pt 3), 557-565.

- Schlaepfer, E., and Speck, R.F. (2008). Anti-HIV activity mediated by natural killer and CD8+ cells after toll-like receptor 7/8 triggering. *PLoS One* 3, e1999.
- Schmidt-Weber, C.B., and Blaser, K. (2004). Regulation and role of transforming growth factor-beta in immune tolerance induction and inflammation. *Curr Opin Immunol* 16, 709-716.
- Schmidt, K.N., Leung, B., Kwong, M., Zarembek, K.A., Satyal, S., Navas, T.A., Wang, F., and Godowski, P.J. (2004). APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol* 172, 138-143.
- Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T.U., and Berg, T. (2006). Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol* 13, 1235-1242.
- Screpanti, V., Wallin, R.P., Grandien, A., and Ljunggren, H.G. (2005). Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol* 42, 495-499.
- Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., Deschaseaux, F. (2008). Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* 1, 212-22.
- Semino, C., Angelini, G., Poggi, A., and Rubartelli, A. (2005). NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 106, 609-616.
- Sen, M., Tosca, P.J., Zwayer, C., Ryan, M.J., Johnson, J.D., Knostman, K.A., Giclas, P.C., Peggins, J.O., Tomaszewski, J.E., McMurray, T.P., *et al.* (2009). Lack of toxicity of a STAT3 decoy oligonucleotide. *Cancer Chemother Pharmacol* 63, 983-995.
- Sers, C., Kuner, R., Falk, C.S., Lund, P., Sueltmann, H., Braun, M., Buness, A., Ruschhaupt, M., Conrad, J., Mang-Fatehi, S., *et al.* (2009). Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 125, 1626-1639.
- Shah, N.G., Trivedi, T.I., Tankshali, R.A., Goswami, J.A., Jetly, D.H., Kobawala, T.P., Shukla, S.N., Shah, P.M., and Verma, R.J. (2006). Stat3 expression in oral squamous cell carcinoma: association with clinicopathological parameters and survival. *Int J Biol Markers* 21, 175-183.
- Shain, K.H., Yarde, D.N., Meads, M.B., Huang, M., Jove, R., Hazlehurst, L.A., and Dalton, W.S. (2009). Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer Res* 69, 1009-1015.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Sher, A., Oswald, I.P., Hieny, S., and Gazzinelli, R.T. (1993). Toxoplasma gondii induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 150, 3982-3989.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163, 5211-5218.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., and *et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.
- Shrikant, P., Khoruts, A., and Mescher, M.F. (1999). CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+ T cell- and IL-2-dependent mechanism. *Immunity* 11, 483-493.
- Shum, B.P., Flodin, L.R., Muir, D.G., Rajalingam, R., Khakoo, S.I., Cleland, S., Guethlein, L.A., Uhrberg, M., and Parham, P. (2002). Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. *J Immunol* 168, 240-252.
- Silverstein, A.M. (2002). The collected papers of Paul Ehrlich : why was volume 4 never published? *Bull Hist Med* 76, 335-339.
- Siren, J., Sareneva, T., Pirhonen, J., Strengell, M., Veckman, V., Julkunen, I., and Matikainen, S. (2004). Cytokine and contact-dependent activation of natural killer cells by influenza A or Sendai virus-infected macrophages. *J Gen Virol* 85, 2357-2364.
- Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., and

- Moretta, A. (2004). CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10116-10121.
- Sivori, S., Parolini, S., Falco, M., Marcenaro, E., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2000a). 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol* *30*, 787-793.
- Sivori, S., Parolini, S., Marcenaro, E., Castriconi, R., Pende, D., Millo, R., and Moretta, A. (2000b). Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* *107*, 220-225.
- Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* *29*, 1656-1666.
- Smalley, W.E., and DuBois, R.N. (1997). Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* *39*, 1-20.
- Smith, H.R., Heusel, J.W., Mehta, I.K., Kim, S., Dorner, B.G., Naidenko, O.V., Iizuka, K., Furukawa, H., Beckman, D.L., Pingel, J.T., *et al.* (2002). Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 8826-8831.
- Smith, K.M., Wu, J., Bakker, A.B., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1998). Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *J Immunol* *161*, 7-10.
- Smyth, M.J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrot, R.H., Sedger, L.M., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001a). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* *193*, 661-670.
- Smyth, M.J., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2001b). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* *13*, 459-463.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* *90*, 1-50.
- Smyth, M.J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W.M., and Hayakawa, Y. (2005). NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med* *202*, 583-588.
- Smyth, M.J., Swann, J., Kelly, J.M., Cretney, E., Yokoyama, W.M., Diefenbach, A., Sayers, T.J., and Hayakawa, Y. (2004). NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med* *200*, 1325-1335.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* *192*, 755-760.
- Son, G., Iimuro, Y., Seki, E., Hirano, T., Kaneda, Y., and Fujimoto, J. (2007). Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *293*, G631-639.
- Song, H., Wang, R., Wang, S., and Lin, J. (2005). A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 4700-4705.
- Spaggiari, G.M., Carosio, R., Pende, D., Marcenaro, S., Rivera, P., Zocchi, M.R., Moretta, L., and Poggi, A. (2001). NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *Eur J Immunol* *31*, 1656-1665.
- Spits, H., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1995). Development of human T and natural killer cells. *Blood* *85*, 2654-2670.
- Sporri, R., Joller, N., Albers, U., Hilbi, H., and Oxenius, A. (2006). MyD88-dependent IFN-gamma production by NK cells is key for control of *Legionella pneumophila* infection. *J Immunol* *176*, 6162-6171.
- Stark, S., and Watzl, C. (2006). 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *Int Immunol* *18*, 241-247.
- Stebbins, C.C., Watzl, C., Billadeau, D.D., Leibson, P.J., Burshtyn, D.N., and Long, E.O. (2003). Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase

SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol Cell Biol* 23, 6291-6299.

Steinle, A., Li, P., Morris, D.L., Groh, V., Lanier, L.L., Strong, R.K., and Spies, T. (2001). Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53, 279-287.

Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D.G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G., *et al.* (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317, 376-381.

Stewart-Akers, A.M., Cunningham, A., Wasko, M.C., and Morel, P.A. (2004). Fc gamma R expression on NK cells influences disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 5, 521-529.

Street, S.E., Cretney, E., and Smyth, M.J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192-197.

Street, S.E., Hayakawa, Y., Zhan, Y., Lew, A.M., MacGregor, D., Jamieson, A.M., Diefenbach, A., Yagita, H., Godfrey, D.I., and Smyth, M.J. (2004). Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. *J Exp Med* 199, 879-884.

Street, S.E., Trapani, J.A., MacGregor, D., and Smyth, M.J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 196, 129-134.

Sugihara, A.Q., Rolle, C.E., and Lesniak, M.S. (2009). Regulatory T cells actively infiltrate metastatic brain tumors. *Int J Oncol* 34, 1533-1540.

Sullivan, K.E., Mullen, C.A., Blaese, R.M., and Winkelstein, J.A. (1994). A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr* 125, 876-885.

Sun, J.C., Beilke, J.N., and Lanier, L.L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457, 557-561.

Sun, S., and Steinberg, B.M. (2002). PTEN is a negative regulator of STAT3 activation in human papillomavirus-infected cells. *J Gen Virol* 83, 1651-1658.

Sutherland, C.L., Chalupny, N.J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., and Cosman, D. (2002). UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 168, 671-679.

Swann, J.B., Vesely, M.D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2008). Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 652-656.

## T

Tabiasco, J., Espinosa, E., Hudrisier, D., Joly, E., Fournie, J.J., and Vercellone, A. (2002). Active trans-synaptic capture of membrane fragments by natural killer cells. *Eur J Immunol* 32, 1502-1508.

Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Onoda, Y., Zhang, H., Yamazaki, S., Miyamoto, A., Honda, S., Lanier, L.L., and Shibuya, A. (2004). Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int Immunol* 16, 533-538.

Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., and Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10, 39-49.

Takeda, K., Cretney, E., Hayakawa, Y., Ota, T., Akiba, H., Ogasawara, K., Yagita, H., Kinoshita, K., Okumura, K., and Smyth, M.J. (2005). TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* 105, 2082-2089.

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3801-3804.

Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195, 161-169.

Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol* 214, 194-200.

Taki, S., Nakajima, S., Ichikawa, E., Saito, T., and Hida, S. (2005). IFN regulatory factor-2 deficiency revealed a novel checkpoint critical for the generation of peripheral NK cells. *J Immunol* 174, 6005-6012.

- Teixeira, H.C., and Kaufmann, S.H. (1994). Role of NK1.1+ cells in experimental listeriosis. NK1+ cells are early IFN-gamma producers but impair resistance to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* *152*, 1873-1882.
- Terme, M., Borg, C., Guilhot, F., Masurier, C., Flament, C., Wagner, E.F., Caillat-Zucman, S., Bernheim, A., Turhan, A.G., Caignard, A., and Zitvogel, L. (2005). BCR/ABL promotes dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *Cancer Res* *65*, 6409-6417.
- Terme, M., Chaput, N., Combadiere, B., Ma, A., Ohteki, T., and Zitvogel, L. (2008). Regulatory T cells control dendritic cell/NK cell cross-talk in lymph nodes at the steady state by inhibiting CD4+ self-reactive T cells. *J Immunol* *180*, 4679-4686.
- Textor, S., Durst, M., Jansen, L., Accardi, R., Tommasino, M., Trunk, M.J., Porgador, A., Watzl, C., Gissmann, L., and Cerwenka, A. (2008). Activating NK cell receptor ligands are differentially expressed during progression to cervical cancer. *Int J Cancer* *123*, 2343-2353.
- Thomas, M., Boname, J.M., Field, S., Nejentsev, S., Salio, M., Cerundolo, V., Wills, M., and Lehner, P.J. (2008). Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 1656-1661.
- Thompson, R.H., Allison, J.P., and Kwon, E.D. (2006). Anti-cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Urol Oncol* *24*, 442-447.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* *287*, 1031.
- Tosi, D., Valenti, R., Cova, A., Sovena, G., Huber, V., Pilla, L., Arienti, F., Belardelli, F., Parmiani, G., and Rivoltini, L. (2004). Role of cross-talk between IFN-alpha-induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8+ T cell responses against human tumor antigens. *J Immunol* *172*, 5363-5370.
- Townsend, M.J., Weinmann, A.S., Matsuda, J.L., Salomon, R., Farnham, P.J., Biron, C.A., Gapin, L., and Glimcher, L.H. (2004). T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* *20*, 477-494.
- Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* *2*, 735-747.
- Treanor, B., Lanigan, P.M., Kumar, S., Dunsby, C., Munro, I., Auksoorius, E., Culley, F.J., Purbhoo, M.A., Phillips, D., Neil, M.A., *et al.* (2006). Microclusters of inhibitory killer immunoglobulin-like receptor signaling at natural killer cell immunological synapses. *J Cell Biol* *174*, 153-161.
- Trinchieri, G., and Valiante, N. (1993). Receptors for the Fc fragment of IgG on natural killer cells. *Nat Immun* *12*, 218-234.
- Trotta, R., Kanakaraj, P., and Perussia, B. (1996). Fc gamma R-dependent mitogen-activated protein kinase activation in leukocytes: a common signal transduction event necessary for expression of TNF-alpha and early activation genes. *J Exp Med* *184*, 1027-1035.
- Trundley, A., Frebel, H., Jones, D., Chang, C., and Trowsdale, J. (2007). Allelic expression patterns of KIR3DS1 and 3DL1 using the Z27 and DX9 antibodies. *Eur J Immunol* *37*, 780-787.
- Turkson, J., Kim, J.S., Zhang, S., Yuan, J., Huang, M., Glenn, M., Haura, E., Sebt, S., Hamilton, A.D., and Jove, R. (2004a). Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity. *Mol Cancer Ther* *3*, 261-269.
- Turkson, J., Ryan, D., Kim, J.S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sebt, S., Hamilton, A.D., and Jove, R. (2001). Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* *276*, 45443-45455.
- Turkson, J., Zhang, S., Mora, L.B., Burns, A., Sebt, S., and Jove, R. (2005). A novel platinum compound inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells. *J Biol Chem* *280*, 32979-32988.
- Turkson, J., Zhang, S., Palmer, J., Kay, H., Stanko, J., Mora, L.B., Sebt, S., Yu, H., and Jove, R. (2004b). Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther* *3*, 1533-1542.

## U

- Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L., and Parham, P. (1997). Human

diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7, 753-763.

Ulbrecht, M., Martinozzi, S., Grzeschik, M., Hengel, H., Ellwart, J.W., Pla, M., and Weiss, E.H. (2000). Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol* 164, 5019-5022.

Upshaw, J.L., Arneson, L.N., Schoon, R.A., Dick, C.J., Billadeau, D.D., and Leibson, P.J. (2006). NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol* 7, 524-532.

Urosevic, M., and Dummer, R. (2008). Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting. *Cancer Res* 68, 627-630.

## V

Vacca, P., Pietra, G., Falco, M., Romeo, E., Bottino, C., Bellora, F., Prefumo, F., Fulcheri, E., Venturini, P.L., Costa, M., *et al.* (2006). Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* 108, 4078-4085.

Vajdic, C.M., and van Leeuwen, M.T. (2009). Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer* 125, 1747-1754.

Vales-Gomez, M., Erskine, R.A., Deacon, M.P., Strominger, J.L., and Reyburn, H.T. (2001). The role of zinc in the binding of killer cell Ig-like receptors to class I MHC proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1734-1739.

Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., Lopez-Botet, M., and Strominger, J.L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J* 18, 4250-4260.

Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., and Strominger, J. (1998). Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14326-14331.

Valiante, N.M., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Parham, P. (1996). Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a pp36/PLC-gamma signaling complex in human natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 184, 2243-2250.

van den Broek, M.E., Kagi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W.K., Melief, C.J., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 184, 1781-1790.

Vance, R.E., Jamieson, A.M., and Raulet, D.H. (1999). Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1801-1812.

Vance, R.E., Kraft, J.R., Altman, J.D., Jensen, P.E., and Raulet, D.H. (1998). Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J Exp Med* 188, 1841-1848.

Veillette, A. (2006). NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Immunol Rev* 214, 22-34.

Velardi, A., Ruggeri, L., Mancusi, A., Aversa, F., and Christiansen, F.T. (2009). Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr Opin Immunol* 21, 525-530.

Venkataraman, G.M., Suci, D., Groh, V., Boss, J.M., and Spies, T. (2007). Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* 178, 961-969.

Vetter, C.S., Groh, V., Straten, P., Spies, T., Brocker, E.B., and Becker, J.C. (2002). Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol* 118, 600-605.

Vignais, M.L., Sadowski, H.B., Watling, D., Rogers, N.C., and Gilman, M. (1996). Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol Cell Biol* 16, 1759-1769.

Viguier, M., Lemaitre, F., Verola, O., Cho, M.S., Gorochov, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P., and Ferradini, L. (2004). Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173, 1444-1453.

Vilarinho, S., Ogasawara, K., Nishimura, S., Lanier, L.L., and Baron, J.L. (2007). Blockade of NKG2D on NKT cells prevents hepatitis and the acute immune response to hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18187-18192.

- Villegas, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jimenez, R., Chillon, M.J., Jareno, J., Zuil, M., and Collol, L. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35, 23-28.
- Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Zambello, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2001). Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur J Immunol* 31, 233-242.
- Vivier, E., Nunes, J.A., and Vely, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306, 1517-1519.
- von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6, 338-344.
- Voskoboinik, I., Smyth, M.J., and Trapani, J.A. (2006). Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 6, 940-952.
- Vosshenrich, C.A., Ranson, T., Samson, S.I., Corcuff, E., Colucci, F., Rosmaraki, E.E., and Di Santo, J.P. (2005a). Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J Immunol* 174, 1213-1221.
- Vosshenrich, C.A., Samson-Villeger, S.I., and Di Santo, J.P. (2005b). Distinguishing features of developing natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 17, 151-158.
- Vujanovic, N.L., Nagashima, S., Herberman, R.B., and Whiteside, T.L. (1996). Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells. *J Immunol* 157, 1117-1126.
- Vyas, Y.M., Maniar, H., and Dupont, B. (2002). Visualization of signaling pathways and cortical cytoskeleton in cytolytic and noncytolytic natural killer cell immune synapses. *Immunol Rev* 189, 161-178.
- Vyas, Y.M., Maniar, H., Lyddane, C.E., Sadelain, M., and Dupont, B. (2004). Ligand binding to inhibitory killer cell Ig-like receptors induce colocalization with Src homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase 1 and interruption of ongoing activation signals. *J Immunol* 173, 1571-1578.
- Vyas, Y.M., Mehta, K.M., Morgan, M., Maniar, H., Butros, L., Jung, S., Burkhardt, J.K., and Dupont, B. (2001). Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J Immunol* 167, 4358-4367.
- Waldhauer, I., and Steinle, A. (2006). Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* 66, 2520-2526.
- Wang, E.C., McSharry, B., Retiere, C., Tomasec, P., Williams, S., Borysiewicz, L.K., Braud, V.M., and Wilkinson, G.W. (2002). UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7570-7575.
- Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D., and Yu, H. (2009a). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* 206, 1457-1464.
- Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., et al. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10, 48-54.
- Wang, Z., Kong, D., Li, Y., and Sarkar, F.H. (2009b). PDGF-D signaling: a novel target in cancer therapy. *Curr Drug Targets* 10, 38-41.
- Ware, M.D., Rosten, P., Damen, J.E., Liu, L., Humphries, R.K., and Krystal, G. (1996). Cloning and characterization of human SHIP, the 145-kD inositol 5-phosphatase that associates with SHC after cytokine stimulation. *Blood* 88, 2833-2840.
- Waskow, C., and Rodewald, H.R. (2002). Lymphocyte development in neonatal and adult c-Kit-deficient (c-Kit<sup>W/W</sup>) mice. *Adv Exp Med Biol* 512, 1-10.
- Watson, N.F., Ramage, J.M., Madjd, Z., Spendlove, I., Ellis, I.O., Scholefield, J.H., and Durrant, L.G. (2006a). Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer* 118, 6-10.
- Watson, N.F., Spendlove, I., Madjd, Z., McGilvray, R., Green, A.R., Ellis, I.O., Scholefield, J.H., and Durrant, L.G. (2006b). Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 118, 1445-1452.
- Watzl, C., Stebbins, C.C., and Long, E.O. (2000). NK cell inhibitory receptors prevent tyrosine

phosphorylation of the activation receptor 2B4 (CD244). *J Immunol* 165, 3545-3548.

Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P., Mottram, P., Curiel, T., Lange, A., and Zou, W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 65, 5020-5026.

Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., and Steinle, A. (2006). Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol* 7, 1334-1342.

Wiemann, K., Mittrucker, H.W., Feger, U., Welte, S.A., Yokoyama, W.M., Spies, T., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2005). Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* 175, 720-729.

Williams, N.S., Klem, J., Puzanov, I.J., Sivakumar, P.V., Bennett, M., and Kumar, V. (1999). Differentiation of NK1.1+, Ly49+ NK cells from flt3+ multipotent marrow progenitor cells. *J Immunol* 163, 2648-2656.

Winter, C.C., Gumperz, J.E., Parham, P., Long, E.O., and Wagtmann, N. (1998). Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 161, 571-577.

Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser, L.R., and June, C.H. (2001). Regulatory CD4(+)/CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61, 4766-4772.

Wu, J., and Lanier, L.L. (2003). Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 90, 127-156.

Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730-732.

Wu, J.D., Higgins, L.M., Steinle, A., Cosman, D., Haugk, K., and Plymate, S.R. (2004). Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* 114, 560-568.

## X

Xi, S., Gooding, W.E., and Grandis, J.R. (2005). In vivo antitumor efficacy of STAT3 blockade using a transcription factor decoy approach: implications for cancer therapy. *Oncogene* 24, 970-979.

Xie, T.X., Huang, F.J., Aldape, K.D., Kang, S.H., Liu, M., Gershenwald, J.E., Xie, K., Sawaya, R., and Huang, S. (2006). Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res* 66, 3188-3196.

Xie, T.X., Wei, D., Liu, M., Gao, A.C., Ali-Osman, F., Sawaya, R., and Huang, S. (2004). Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 23, 3550-3560.

Xu, X., Fu, X.Y., Plate, J., and Chong, A.S. (1998). IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 58, 2832-2837.

## Y

Yadav, D., Ngolab, J., Lim, R.S., Krishnamurthy, S., and Bui, J.D. (2009). Cutting edge: down-regulation of MHC class I-related chain A on tumor cells by IFN-gamma-induced microRNA. *J Immunol* 182, 39-43.

Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.

Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., *et al.* (2008a). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29, 44-56.

Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., *et al.* (2008b). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28, 29-39.

Yang, Y.F., Zou, J.P., Mu, J., Wijesuriya, R., Ono, S., Walunas, T., Bluestone, J., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. (1997). Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages. *Cancer Res* 57, 4036-4041.

Yen, J.H., Moore, B.E., Nakajima, T., Scholl, D., Schaid, D.J., Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (2001). Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 193, 1159-1167.

- Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J., and Reeves, S.A. (2000). Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol* 10, 47-50.
- Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S., and Gruss, P. (1999). Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397, 702-706.
- Yokoyama, W.M., and Plougastel, B.F. (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 3, 304-316.
- Yoshida, T., Hanada, T., Tokuhisa, T., Kosai, K., Sata, M., Kohara, M., and Yoshimura, A. (2002). Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med* 196, 641-653.
- Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7, 454-465.
- Yu, C.L., Meyer, D.J., Campbell, G.S., Larner, A.C., Carter-Su, C., Schwartz, J., and Jove, R. (1995). Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269, 81-83.
- Yu, H., Fehniger, T.A., Fuchshuber, P., Thiel, K.S., Vivier, E., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (1998). Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 92, 3647-3657.
- Yu, H., Kortylewski, M., and Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 7, 41-51.
- Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9, 798-809.
- Yuan, Z.L., Guan, Y.J., Chatterjee, D., and Chin, Y.E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 307, 269-273.
- Yusa, S., and Campbell, K.S. (2003). Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells. *J Immunol* 170, 4539-4547.
- Zeng, Y., Huebener, N., Fest, S., Weixler, S., Schroeder, U., Gaedicke, G., Xiang, R., Schramm, A., Eggert, A., Reisfeld, R.A., and Lode, H.N. (2007). Fractalkine (CX3CL1)- and interleukin-2-enriched neuroblastoma microenvironment induces eradication of metastases mediated by T cells and natural killer cells. *Cancer Res* 67, 2331-2338.
- Zeuthen, J., Dzhandzhugazyan, K., Hansen, M.R., and Kirkin, A.F. (1998). The immunogenic properties of human melanomas and melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Bratisl Lek Listy* 99, 426-434.
- Zhang, C., Niu, J., Zhang, J., Wang, Y., Zhou, Z., and Tian, Z. (2008). Opposing effects of interferon-alpha and interferon-gamma on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors. *Cancer Sci* 99, 1279-1286.
- Zhang, C., Wang, Y., Zhou, Z., Zhang, J., and Tian, Z. (2009). Sodium butyrate upregulates expression of NKG2D ligand MICA/B in HeLa and HepG2 cell lines and increases their susceptibility to NK lysis. *Cancer Immunol Immunother* 58, 1275-1285.
- Zhang, Q., Wang, H.Y., Liu, X., and Wasik, M.A. (2007). STAT5A is epigenetically silenced by the tyrosine kinase NPM1-ALK and acts as a tumor suppressor by reciprocally inhibiting NPM1-ALK expression. *Nat Med* 13, 1341-1348.
- Zhang, Q., Wang, H.Y., Marzec, M., Raghunath, P.N., Nagasawa, T., and Wasik, M.A. (2005). STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6948-6953.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8, 591-599.
- Zhang, Y., Cho, Y.Y., Petersen, B.L., Bode, A.M., Zhu, F., and Dong, Z. (2003). Ataxia telangiectasia mutated proteins, MAPKs, and RSK2 are involved in the phosphorylation of STAT3. *J Biol Chem* 278, 12650-12659.
- Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J.E., Jr. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95-98.
- Zhou, L., Ivanov, II, Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8, 967-974.

Z

Zompi, S., Hamerman, J.A., Ogasawara, K., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V.L., Di Santo, J.P., Lanier, L.L., and Colucci, F. (2003). NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat Immunol* 4, 565-572.

Zorn, E., Nelson, E.A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., Bellucci, R., Raderschall, E.,

Canning, C., Soiffer, R.J., *et al.* (2006). IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 108, 1571-1579.

# ***Annexes***



## Brief report

## Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation

Jean R. Pallandre,<sup>1</sup> Konrad Krzewski,<sup>2</sup> Romain Bedel,<sup>1</sup> Bernhard Ryffel,<sup>3</sup> Anne Caignard,<sup>4</sup> Pierre Simon Rohrllich,<sup>1</sup> Xavier Pivot,<sup>1,5</sup> Pierre Tiberghien,<sup>1</sup> Laurence Zitvogel,<sup>6</sup> Jack L. Strominger,<sup>2</sup> and Christophe Borg<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Inserm U645, EFS Bourgogne Franche Comté, University of Franche-Comté, IFR133, Besançon, France; <sup>2</sup>Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA; <sup>3</sup>GEM2358, CNRS, Orleans, France; <sup>4</sup>Inserm U753, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>5</sup> Department of Medical Oncology, CHU Jean Minjot, Besançon, France; and <sup>6</sup>Inserm U805, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

**Initial molecular events leading to natural killer lymphocyte (NK) and dendritic cell (DC) interactions are largely unknown. Here, the role of CX3CL1 (fractalkine), a chemokine expressed on mature dendritic cells (mDCs) has been investigated. We show that CX3CL1 promotes NK activation by mDCs. After blocking of CX3CL1 by antibody, no activation occurred but major histocompatibility complex (MHC) class I neutralization restored DC-**

**mediated NK activation, suggesting an interaction between CX3CL1 signaling and the functioning of inhibitory KIR. Then the YTS NK cell line, in which the inhibitory receptor KIR2DL1 had been introduced, was used. The presence of KIR2DL1 did not decrease YTS activation by HLA-Cw4 DC when CX3CL1 was functional. In contrast, CX3CL1 neutralization led to killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) phosphorylation and SHP-1**

**recruitment in YTS<sup>KIR2DL1</sup> cultured with HLA-Cw4 mDCs. Moreover, CX3CL1 neutralization promoted dispersion of lipid rafts and the formation of a multiprotein complex required for cytoskeletal rearrangements in YTS NK cells. These findings point to a pivotal role of CX3CL1 in the activation of resting NK cells by mature DCs. (Blood. 2008;112:4420-4424)**

## Introduction

Natural killer (NK) cell activation is initiated when NK cells form tight contacts with target cells.<sup>1-4</sup> However, this activation can be abrogated by interactions between major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs). SHP-1 is then recruited to the KIR intracytoplasmic domain and a dominant inhibition of cytoskeletal and lipid raft polarization occurs, protecting MHC class I-positive targets from autologous NK cell-mediated cytotoxicity.<sup>5-11</sup>

We have previously described another type of synapse (DCNK-IS) that regulates DC-mediated NK activation.<sup>12</sup> This dynamic network in which NK interacts with surrounding DC was also described *in vivo* during *Leishmania major* infection.<sup>13</sup> The DCNK-IS has been shown to enable optimal NK activation by IL-15 and to display a spatial organization distinct from the classic target/NK synapses.<sup>12,14,15</sup> However, the initial molecular events governing mature DC (mDC) and NK interactions remain to be identified. In particular, the mechanisms allowing autologous resting NK activation by mDCs in the presence of KIR on NK cells and self-MHC proteins on DCs, have not been studied.

Animal Ethics Committee. C57BL/6 CX3CR1-knockout mice<sup>16</sup> were provided by Bernhard Ryffel (GEM2358, CNRS, Orleans, France).

## Dendritic cell differentiation

Human DCs were generated from adherence-selected monocytes in AIMV complete medium containing 1000 IU/mL of both rhuGM-CSF and rhuIL-4 (Peprotech, Neuilly-sur-seine, Saint-Quentin, France). DCs were exposed to lipopolysaccharide (LPS; 1  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich, France), characterized and used at day 6, as previously described.<sup>12</sup> Mouse bone marrow-derived DCs (BMDCs) were differentiated as previously described.<sup>12</sup>

## Purification of NK cells

NK cells were negatively selected from Ficoll-separated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using the Miltenyi NK-cell isolation kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) prior to coculture with mDCs. The purity of NK cells was assessed by flow cytometry (anti-CD56 [B159] and anti-CD3 [UCHT1] mAb [BD PharMingen, San Diego, CA]) and ranged from 90% to 98%. In some experiments, NK cells were additionally selected according to KIR2DL1 (clone 143211; R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) expression using fluorescence-activated cell sorting.

## Slide preparation and confocal microscopy

mDCs ( $5 \times 10^4$ ) and NK cells ( $10^5$ ) were mixed and spread onto poly-L-lysine-coated slides (Sigma, France) for 25 minutes at 37°C. Cells were fixed and permeabilized with 0.2% sodium dodecyl sulfate. After 20 minutes of blocking in 20% fetal bovine serum and washing, cells were stained

## Methods

## Mice

C57BL/6 mice were obtained from Janvier (Le Genest St Isle, France), and maintained in the IFR133 animal facility according to the guidelines of the

Submitted December 2, 2007; accepted April 1, 2008. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, August 5, 2008; DOI 10.1182/blood-2007-12-126888.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2008 by The American Society of Hematology

with the appropriate mAbs. Stacks of confocal images were collected with an Olympus FV1000 laser scanning confocal microscope.

### Cell labeling and antibodies

Phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) and cholera toxin  $\beta$  subunit (CTX; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were used to detect polymerized F-actin and raft-associated GM1 gangliosides. NK cells were imaged using anti-KIR2DL1 (T-20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and PT-100 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Anti-CX3CL1 (51 637) and anti-CCL3 (93 342) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Anti MHC class I (W6/32) were from Diaclone (Besançon, France). Cytoskeletal organization was studied using anti-FLAG, anti-myosin IIa, and anti-actin from Sigma-Aldrich. Secondary antibodies were purchased from Molecular Probes.

### Reagents

Human IL-2 (1000 IU/mL) was obtained from Chiron (Amsterdam, The Netherlands). NK cells were treated with pertussis toxin (PTx; 100 ng/mL; Sigma-Aldrich) to block G $\alpha$ i proteins. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were from Diaclone. A single cell-based, fluorogenic cytotoxicity assay (CyToxiLux) was used to measure target cell death (OncoImmunin, Gaithersburg, MD).<sup>17</sup>

### Statistical analysis

Results are expressed as the mean plus or minus the standard error of the mean (SEM). Group comparisons were performed using Student *t* test.

## Results and discussion

CX3CL1 is both a soluble and a membrane-anchored chemokine expressed by DCs and up-regulated upon maturation, while its receptor CX3CR1 is expressed on NK cells.<sup>18,19</sup> To address the role of CX3CL1 in DC and NK-cell cross-talk, autologous resting human NK and mDCs were cultured 24 hours in the presence of CCL3-neutralizing mAb as control (5  $\mu$ g/mL) or CX3CL1 neutralizing mAb (5  $\mu$ g/mL). An alternative mode of NK-cell activation by IL-2 was included as a control. CX3CL1 but not CCL3 mAb prevented mDC-mediated NK IFN- $\gamma$  production (Figure 1A) and cytotoxicity (Figure 1B).

To confirm the role of CX3CL1 signaling, NK cells from wild-type and CX3CR1 knockout mice were cocultured with mature autologous BMDCs. While NK cells from CX3CR1-deficient and wild-type mice exposed to IL-2 produced equivalent levels of IFN- $\gamma$ , the CX3CR1 knock-out abrogated the ability of NK cells to produce IFN- $\gamma$  in response to mDCs (Figure 1C;  $P = .015$ ).

CX3CR1 receptors in NK cells are coupled to G $\alpha$ i-class G proteins.<sup>19</sup> Human NK cells were treated with the G $\alpha$ i-protein inhibitor PTx to further characterize the role of CX3CR1 signal transduction. PTx-pretreated NK cells produced IFN- $\gamma$  in response to IL-2, but not when exposed to mDCs (Figure 1D).

Next, the role of CX3CL1 in DC/NK conjugate formation was studied. Indeed, 9% ( $\pm$  2%), 24% ( $\pm$  4%), and 34% ( $\pm$  5%) of mDCs formed tight conjugates with a single resting NK cell at 5, 25, and 60 minutes, respectively, while only 3.5% ( $\pm$  1%), 8.5% ( $\pm$  3%), and 17% ( $\pm$  4%) of mDCs did so after blocking CX3CL1 (Figure 1E). Altogether, the data shown in Figure 1 imply that CX3CL1 on DCs drives a molecular pathway that promotes NK-cell activation initiated through CX3CR1.

Receptor-ligand binding between MHC class I and inhibitory KIR leads to a negative signal that impairs activating synapse formation.<sup>10</sup> Therefore, the MHC class I/KIR interaction according

to CX3CL1 expression in DC/NK cultures was examined. After blocking of CX3CL1, activation by mDCs of human autologous resting NK cells was restored by anti-MHC class I mAb treatment (Figure 2A), suggesting a direct relation between CX3CL1 signaling and KIR function.

One such receptor-ligand interaction could be specifically investigated using the KIR-negative NK cell line YTS and its transfectants expressing KIR2DL1 or the mutant KIR2DL1(1-250) lacking the cytoplasmic tail in coculture experiments with mDCs generated from HLA-Cw4 homozygous donors. Blocking of CX3CL1 on mDCs inhibited the ability of HLA-Cw4 mDCs to activate YTS<sup>KIR2DL1</sup>, but had no effect when YTS<sup>KIR2DL1</sup><sup>1-250</sup> was used (Figure 2B).

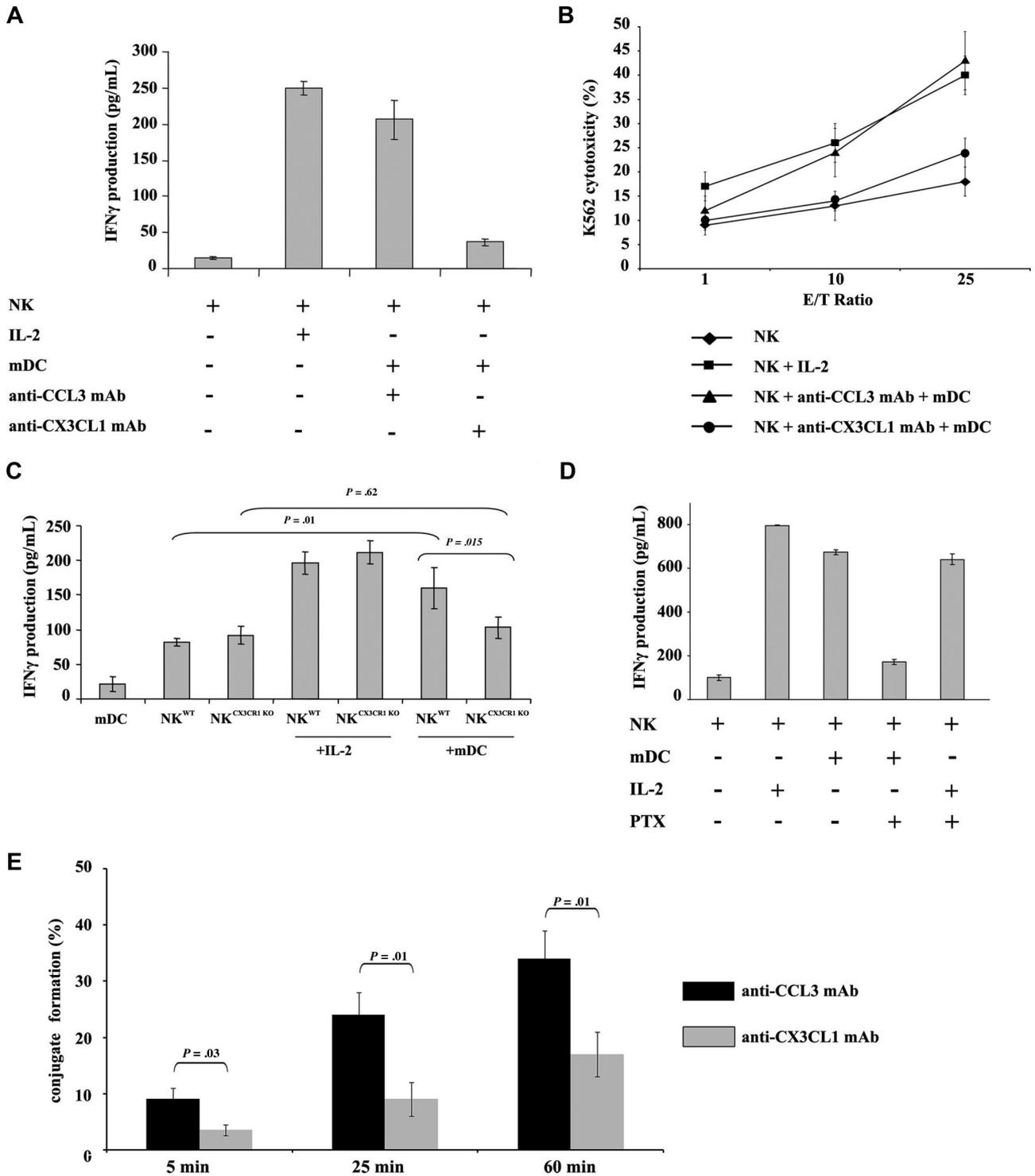
Distribution of KIRs was then examined by confocal microscopy. As recently described,<sup>14</sup> KIRs were present at 5 minutes at the synapse after conjugation in 74% plus or minus 3% and 70% plus or minus 6% of DC/NK conjugates exposed to either anti-CCL3 or anti-CX3CL1 mAb respectively ( $P = .29$ ). After 25 minutes, KIR expression decreased from the interface of DC/NK conjugates in the presence of control anti-CCL3mAb (Figure 2C left). By contrast, KIRs accumulated at the interface of 41% ( $\pm$  8%) DC/NK conjugates in the presence of anti-CX3CL1 mAb (Figure 2C right) compared with 14% ( $\pm$  5%) in the presence of anti-CCL3 mAb (Figure 2C left;  $P = .012$ ).

To further assess the function of inhibitory KIRs during mDC and NK cell interactions, phosphorylation of KIR2DL1 was investigated. For this purpose, YTS<sup>KIR2DL1</sup> cells were cultured for 0, 3, or 10 minutes at 37°C with HLA-Cw4 mDCs before KIR2DL1 immunoprecipitation. KIR2DL1 was not phosphorylated in HLA-Cw4 mDC/YTS<sup>KIR2DL1</sup> coculture in presence of control anti-CCL3mAb. By contrast, CX3CL1 neutralization in the YTS<sup>KIR2DL1</sup>/mDC cocultures allowed KIR2DL1 phosphorylation and led to SHP1 recruitment (Figure 2D) and failure to activate NK cells (Figure 1A,B).

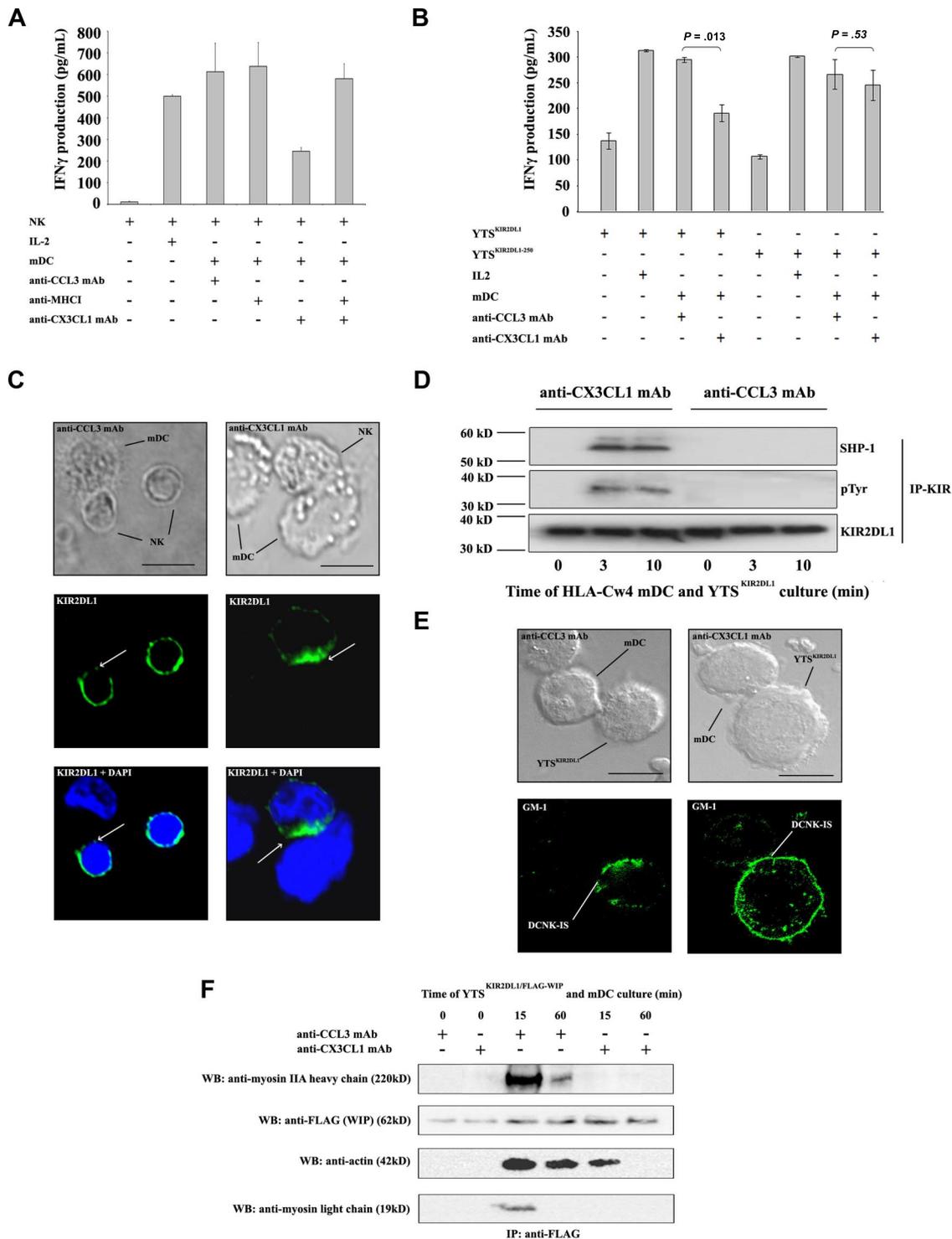
In addition, these experiments were reproduced using human peripheral NK cells sorted into either KIR2DL1<sup>+</sup> or KIR2DL1<sup>-</sup> subsets and exposed to autologous HLA-Cw4 mDCs. Using the KIR2DL1 NK cells, CX3CL1 prevented the inhibitory signal resulting from KIR binding to MHC class I during the DC/NK interaction (Figure S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

KIR signaling induces GM1-enriched lipid raft exclusion from the synaptic region and prevents formation of a multiprotein complex, containing both Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and WASp-interacting protein (WIP) required for actin cytoskeleton remodeling at the synapse.<sup>7-10,20</sup> During DC/NK-IS formation, lipid rafts accumulated at the synapse in the presence of control anti-CCL3 mAb when CX3CL1 was functioning normally to inhibit KIR function. However, when CX3CL1 was neutralized by mAb and KIR function was restored, then GM1-enriched lipid rafts were dispersed. CX3CL1 mAb prevented the accumulation of these rafts in DC/NK-IS (Figure 2E). Finally, stably expressing FLAG-WIP/YTS<sup>KIR2DL1</sup> was used to define the cytoskeletal complex in NK cells. Analysis of anti-FLAG immunoprecipitates revealed that YTS<sup>KIR2DL1</sup> activation by HLA-Cw4 mDCs allowed recruitment of actin and myosin IIA to the WIP complex. In the presence of CX3CL1-neutralizing mAb, this complex could not be formed. CX3CL1 neutralization decreased actin binding to WIP and prevented myosin IIA recruitment (Figure 2F).

Thus, CX3CL1 is a pivotal molecule driving IS formation during DC/NK interactions. Besides their classic role in inducing cell migration, chemokine receptors have also been proposed to act



**Figure 1. CX3CL1 is required for NK activation by mDCs.** (A) Autologous resting human NK cells ( $10^5$ ) and mDCs ( $10^4$ ) were cultured in 96-well plates at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator in AIMV medium for 24 hours. CX3CL1 or CCL3-blocking mAb were added to the cultures. NK-derived IFN- $\gamma$  production was assessed in culture supernatants by ELISA. (B) After NK and mDC cocultures, NK cells were counted and cytotoxic functions were assessed against K562 target cells. Data represent means of triplicates plus or minus the standard error (SE). Five independent experiments were performed with similar results. (C) To confirm a role for CX3CR1 signaling in DC-mediated NK cell activation, murine CX3CR1-deficient and wild-type NK cells were cultured with syngeneic wild-type bone marrow–derived DCs for 24 hours. IFN- $\gamma$  production was determined. Results of a representative experiment out of 3 are expressed as the mean of triplicate assays with error bars representing standard deviations from the mean. (D) Human PTX-treated NK cells were cultured with mDCs or IL-2 for 24 hours. Supernatants were harvested to assess IFN- $\gamma$  production. The depicted data represent means of triplicates plus or minus SE of a representative experiment out of 5 performed. (E) The ability of mDCs to form tight conjugates with resting NK cells was studied in the presence or absence of anti-CX3CL1 mAb. mDCs were admixed with resting NK cells (at a 1:2 mDC/NK ratio) and analyzed by transmission light microscopy as described in “Methods.” More than 100 DCs per experiment were examined for their capacity to bind to resting NK cells. The percentages of DCs forming conjugates with NK cells are shown as a mean plus or minus SE of 3 independent experiments.



**Figure 2. CX3CR1 signaling inhibits HLA-C-induced KIR phosphorylation and regulates DCNK-IS organization.** (A) Autologous resting NK cells were exposed to mDCs (10:1 ratio) in the absence or presence of the indicated mAbs, during 24 hours. Anti-MHC class I mAb does not influence IFN- $\gamma$  production in mDC and NK culture. In contrast, anti-MHC class I mAb prevents the effects of CX3CL1 neutralization. (B) HLA-Cw4 mDCs were cocultured for 24 hours in 96-well plates with the KIR-negative NK cell line YTS stably transfected with KIR2DL1 (YTS<sup>KIR2DL1</sup>) or with KIR2DL1(1-250) lacking the KIR intracytoplasmic domain (YTS<sup>KIR2DL1(1-250)</sup>). The levels of IFN- $\gamma$  released in coculture supernatants were measured by ELISA. Data represent means of triplicates plus or minus SE. Five independent experiments were performed with similar results. (C) KIR2DL1 distribution in HLA-Cw4 mDC/autologous NK cocultures was studied by confocal imaging. HLA-Cw4 mDCs were admixed with autologous resting NK cells, spread onto a lysine-coated slide, and cultured 25 minutes at 37°C. After fixation, cells were permeabilized and stained with anti-KIR2DL1 mAb. Normaski (left panel) and fluorescence (right panel) images are shown. Fifty mDCs forming tight conjugates with KIR2DL1-expressing autologous NK cells were analyzed in each condition. (D) YTS<sup>KIR2DL1</sup> were incubated with mDCs (ratio 2:1) during 0, 3, and 10 minutes at 37°C and immunoprecipitated with protein G beads coated with anti-KIR2DL1 mAb (T-20 clone; Santa Cruz). The immunoprecipitate was immunoblotted with anti-SHP-1 mAb (top panel), anti-phosphotyrosine mAb (middle panel), and with anti-KIR2DL1 mAb (clone 2F9, Abcam; bottom panel). (E) Lipid rafts containing ganglioside GM1 were stained using FITC-labeled cholera toxin and analyzed by confocal microscopy. Lipid rafts became clustered at the HLA-Cw4 mDC and YTS<sup>KIR2DL1</sup> cell interface after conjugate formation. CX3CL1 neutralization prevented lipid raft clustering at the DCNK-IS. Representative pictures of 3 independent experiments are reported. Scale bar, 10  $\mu$ m. (F) YTS<sup>KIR2DL1</sup>/WIP-FLAG were mixed with HLA-Cw4 mDCs for the indicated times at 37°C. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG mAb. The formation of a multiprotein complex with or without CX3CL1 mAb blocking was studied as described.<sup>20</sup> Immunoprecipitated proteins were visualized using anti-FLAG, anti-myosin IIA, and anti-actin.

as T-cell costimulators by prolonging the duration of T cell–antigen-presenting cell (APC) interaction and by avoiding premature splitting due to chemoattractant sources.<sup>21</sup> In line with these observations, CX3CL1 signaling is shown here directly to allow IS organization during DC/NK interactions, despite the presence of an inhibitory KIR on NK cells and its cognate HLA-C ligand on DCs. This feature is essential in the physiologic context.

## Acknowledgments

J.R.P. and R.B. received a fellowship from the conseil regional de Franche Comté. This work was also supported by Inserm, the Ligue contre le cancer, comité du Doubs, and comité de Haute Marne and by National Institutes of Health (NIH) grant AI053330.

## References

- Barber DF, Long EO. Coexpression of CD58 or CD48 with intercellular adhesion molecule 1 on target cells enhances adhesion of resting NK cells. *J Immunol.* 2003;170:294-299.
- Riteau B, Barber DF, Long EO. Vav1 phosphorylation is induced by beta2 integrin engagement on natural killer cells upstream of actin cytoskeleton and lipid raft reorganization. *J Exp Med.* 2003;198:469-474.
- Davis DM, Chiu I, Fassett M, et al. The human natural killer cell immune synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:15062-15067.
- Carpen O, Virtanen I, Lehto VP, Saksela E. Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *J Immunol.* 2003;131:2695-2698.
- Eriksson M, Leitz G, Fallman E, et al. Inhibitory receptors alter natural killer cell interactions with target cells yet allow simultaneous killing of susceptible targets. *J Exp Med.* 1999;190:1005-1012.
- Lou Z, Jevremovic D, Billadeau DD, Leibson PJ. A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J Exp Med.* 2000;191:347-354.
- Fassett MS, Davis DM, Valter MM, Cohen GB, Strominger JL. Signaling at the inhibitory natural killer cell immune synapse regulates lipid raft polarization but not class I MHC clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:14547-14552.
- Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, et al. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;2100:14151-14156.
- Campbell KS, Dessing M, Lopez-Botet M, Cella M, Colonna M. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med.* 1996;184:93-100.
- Vyas YM, Maniar H, Dupont B. Visualization of signaling pathways and cortical cytoskeleton in cytolytic and noncytolytic natural killer cell immune synapses. *Immunol Rev.* 2002;189:161-178.
- Vyas YM, Mehta KM, Morgan M, et al. Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J Immunol.* 2001;167:4358-4367.
- Borg C, Jalil A, Laderach D, et al. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood.* 2004;104:3267-3275.
- Bajenoff M, Breart B, Huang AY, et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med.* 2006;203:619-631.
- Brilot F, Strowig T, Roberts SM, Array F, Münz C. NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15R $\alpha$ . *J Clin Invest.* 2007;117:3316-3329.
- Lucas M, Schachterlie W, Oberle K, Pichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity.* 2007;26:503-517.
- Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation.* 2003;107:1009-1016.
- Harcourt J, Alvarez R, Jones LP, Henderson C, Anderson LJ, Tripp RA. Respiratory syncytial viral G protein and G protein CX3C motif adversely affect CX3CR1 T cell responses. *J Immunol.* 2006;176:1600-1608.
- Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, et al. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 1999;29:2551-2559.
- Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91:521-530.
- Krzewski K, Chen X, Orange JS, Strominger JL. Formation of a WIP-, WASP-, actin-, and myosinIIA containing multiprotein complex in activated NK cells and its alteration by KIR inhibitory signaling. *J Cell Biol.* 2006;173:121-132.
- Molon B, Gri G, Bettela M, et al. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol.* 2005;6:465-471.

## Authorship

Contribution: C.B. designed the research and wrote the manuscript; C.B., J.R.P., and R.B. performed research and analyzed experiments; K.K., B.R., and A.C. provided vital reagents; P.S.R., L.Z., and X.P. provided critical suggestions to the study; and P.T. and J.L.S. contributed to the design and writing.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Christophe Borg, Department of Medical Oncology and Cancer Immunotherapy, Inserm U645, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche Comté, 2 Bd Fleming, 25020 Besançon, France; e-mail: christophe.borg@efs.sante.fr.



## Neuropilin-2 expression promotes TGFβ1-mediated epithelial-mesenchymal transition

### in colorectal cancer cells

Camille Grandclement (PharmD)<sup>1,2,3</sup>, **Romain Bedel<sup>1,2,3</sup> (PhD)**, Bernadette Kantelip<sup>4</sup> (MD, PhD), John Wijdenes<sup>5</sup> (PhD), Martin Demarchi<sup>6</sup> (MD), Adeline Bouard<sup>1,2,3</sup>, Jérémy Balland<sup>1,2,3</sup>, Jean-Paul Rémy-Martin<sup>1,2,3</sup>, Michael Klagsbrun<sup>7</sup> (MD, PhD), Christophe Ferrand<sup>1,2,3</sup> (PhD), Xavier Pivot<sup>1,2,3,6</sup> (MD, PhD), Pierre Tiberghien<sup>1,2,3</sup> (MD, PhD), Christophe Borg<sup>1,2,3,6</sup> (MD, PhD).

<sup>1</sup>INSERM UMR 645, F-25020, Besançon, France ; <sup>2</sup>University of Franche-Comté, IFR133, F-25020 Besançon, France; <sup>3</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté F-25020, Besançon, France; <sup>4</sup>CHU Besançon, Department of pathology, 25000 Besançon, France; <sup>5</sup>Gen-Probe Diacclone SAS, 25000 Besançon, France; <sup>6</sup>CHU Besançon, CIC-BT 506, Department of Medical Oncology, 25000 Besançon, France; <sup>7</sup>Department of Surgery and Pathology, Children's hospital, Boston, USA.

Abstract: 201 words; manuscript: 4555 words

**Author's contributions:** C.B. designed the research, analyzed experiments and wrote the manuscript; C.G., R.B., B.K., A.B., J.B. and J.P.R.M. performed research and analyzed experiments; M.K. and J.W. provided critical materials; C.G., M.D., C.F., X.P., P.T. contributed to the design and writing.

### **Corresponding author:**

Christophe Borg, MD PhD  
department of medical oncology  
Cancer Immune Therapy  
UMR 645 INSERM/EFS/UFC  
2 Bd Fleming 25020 Besançon  
University Hospital, Besançon, France  
[christophe.borg@efs.sante.fr](mailto:christophe.borg@efs.sante.fr),

tel: (33) 3 81 61 56 15  
(33) 3 81 66 93 21  
fax: (33) 3 81 61 56 17



**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

**Neuropilin-2 expression promotes TGF $\beta$ 1-mediated epithelial-mesenchymal transition  
in colorectal cancer cells**

Camille Grandclément (PharmD)<sup>1,2,3</sup>, Romain Bedel<sup>1,2,3</sup> (PhD), Bernadette Kantelip<sup>4</sup> (MD, PhD), John Wijdenes<sup>5</sup>(PhD), Martin Demarchi<sup>6</sup>(MD), Adeline Bouard<sup>1,2,3</sup>, Jérémy Balland<sup>1,2,3</sup>, Jean-Paul Rémy-Martin<sup>1,2,3</sup>, Michael Klagsbrun<sup>7</sup>(MD, PhD), Christophe Ferrand<sup>1,2,3</sup>(PhD), Xavier Pivot<sup>1,2,3,6</sup> (MD, PhD), Pierre Tiberghien<sup>1,2,3</sup> (MD, PhD), Christophe Borg<sup>1,2,3,6</sup> (MD, PhD).

<sup>1</sup> INSERM UMR 645, F-25020, Besançon, France ; <sup>2</sup> University of Franche-Comté, IFR133, F-25020 Besançon, France; <sup>3</sup> EFS Bourgogne Franche-Comté F-25020, Besançon, France; <sup>4</sup> CHU Besançon, Department of pathology, 25000 Besançon, France; <sup>5</sup> Gen-Probe Diacclone SAS, 25000 Besançon, France; <sup>6</sup> CHU Besançon, CIC-BT 506, Department of Medical Oncology, 25000 Besançon, France; <sup>7</sup> Department of Surgery and Pathology, Children's hospital, Boston, USA.

Abstract: 201 words; manuscript: 4555 words

**Author's contributions:** C.B. designed the research, analyzed experiments and wrote the manuscript; C.G., R.B., B.K., A.B., J.B. and J.P.R.M. performed research and analyzed experiments; M.K. and J.W. provided critical materials; C.G., M.D., C.F., X.P., P.T. contributed to the design and writing.

**Corresponding author:**

Christophe Borg, MD PhD  
department of medical oncology  
Cancer Immune Therapy  
UMR 645 INSERM/EFS/UFC  
2 Bd Fleming 25020 Besançon  
University Hospital, Besançon, France  
[christophe.borg@efs.sante.fr](mailto:christophe.borg@efs.sante.fr),

tel: (33) 3 81 61 56 15  
(33) 3 81 66 93 21  
fax: (33) 3 81 61 56 17

**Research Article**

**ABSTRACT**

Neuropilins (NRPs), initially characterized as neuronal receptors, act as co-receptors for cancer related growth factors and were recently involved in several signaling pathways leading to cytoskeletal organization, angiogenesis and cancer progression. Then, we sought to investigate the ability of neuropilin-2 (NRP2) to orchestrate epithelial-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer cells. Using specific siRNA to target NRP2 expression, or NRP2 gene transfer, we first observed that NRP2 expression endows HT29 and Colo320 for xenograft formation. The involvement of NRP2 in EMT was suggested by the ability of this receptor to promote colony formation in soft agar experiments. The presence of NRP2 in colorectal carcinoma cell lines was correlated with the acquisition of a mesenchymal phenotype, an overexpression of vimentin and a loss of cytokeratin-20 and E-cadherin expression. NRP2 inhibition by specific siRNA led to a down-regulation of the E-cadherin repressor snail. Moreover, the expression of NRP2 on colon cancer cell lines was shown to promote transforming-growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) signaling, leading to an increased phosphorylation of the Smad2/3 complex in colorectal cancer cell lines. Specific NRP2 inhibition using siRNA prevented the promoter effect of TGF- $\beta$ 1 on colony formation suggesting that NRP2 is a promising target for anti-cancer therapy development to hamper cancer progression.

**Keywords:** Neuropilin, oncogenesis, epithelial-mesenchymal transition, Smad, transforming growth factor- $\beta$ 1.

## **INTRODUCTION**

Neuropilins (NRPs) are transmembrane non-tyrosine kinase glycoproteins originally described in the nervous system. Neuropilin (NRP) family consists of two genes, neuropilin-1 (NRP1) and neuropilin-2 (NRP2). During nervous system development, NRP1 and NRP2 play a critical role in axon retraction and guidance by binding class III semaphorins. <sup>1</sup> Initially characterized as neuronal receptors, NRPs were also found to be expressed in endothelial cells and subsequently were shown to play a role in the development of the vascular system. <sup>2</sup>

NRPs display a short intracytoplasmic tail which does not contain a kinase domain. Initial investigations of neuropilin-dependent molecular pathways suggested that neuropilins can not directly transmit intracellular signals. This led to the proposal that hetero-dimerization with other receptors are required to mediate neuropilin-downstream signaling. One of these co-receptor complexes described so far involves vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) <sup>3-5</sup>. Besides the amplification of VEGFR signaling, NRPs might interact with plexins to mediate class 3 semaphorin signal transduction via Rho-related G proteins, modulating cytoskeleton organization. <sup>6</sup>

Nevertheless, a highly conserved amino-acids sequence promoting NRPs intracellular tail binding to the PDZ domain of GAIP-C terminus interacting protein-1 (GIPC-1) was recently reported suggesting the possibility that NRPs might regulate alternative biological functions. <sup>7</sup>

The multiple functions of NRPs were recently highlighted by the identification of NRP role in oncogenesis. NRP2 expression was identified in colon carcinoma and directly promotes tumor progression in a cell autonomous manner. It was suggested that NRP2 oncogenic properties rely on an increased VEGFR1 phosphorylation and an activation of the VEGFR1/Pi3K/Akt signaling. <sup>8</sup> However, the precise molecular pathways driven by NRP2 and involved in oncogenesis remain largely unknown.

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is one of the major molecular mechanisms carried out during oncogenesis to promote cancer progression. EMT is characterized by a breakdown of cell junctions and the loss of epithelial characteristics and cell polarity, contributing to carcinoma progression. Besides the gain of mesenchymal markers, EMT endows cancer cell for migration, invasiveness and subsequent dissemination of tumor cells. <sup>9</sup> Despite several

**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

studies pertaining to the role of NRP2 in cancer progression, no substantial evidence established an involvement of this molecular pathway in EMT.

Here, we used colon cancer cell lines transfected with NRP2 transgene or siRNA to investigate NRP2 involvement in EMT. Using NRP2 gene transfer we showed that NRP2 endows colon cancer cell lines for colony and xenograft formation. Then, we examined the influence of NRP2 on transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) signaling that is believed to contribute to the late-stage carcinoma by inducing EMT and promoting metastasis. NRP2 enhanced TGF- $\beta$ 1-induced Smad2/3 phosphorylation and colony formation in colon cancer cells. Moreover, specific inhibition of NRP2 using siRNA prevented TGF- $\beta$ 1-mediated promotion of colony formation. Our study provides evidence that NRP2 cooperates with TGF- $\beta$ 1 signaling to promote to EMT in colorectal carcinoma.

## **RESULTS**

### **Expression of NRP2 human cancer cell lines**

We first sought to examine the expression of NRP2 glycoprotein in various cancer cell lines. Immunofluorescence analysis confirmed that NRP2 is expressed at the membrane of several human cancer cell lines (Figure 1A). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), isolated from normal human umbilical vein, were used as a positive control for NRP2 expression. We observed NRP2 expression at the membrane of 2 out of 3 colon cancer cell lines (SW620, Colo320 but not HT29). NRP2 was also expressed in all renal cancer cell lines tested (Caki, R3III and A498) and in two pancreatic cancer cell lines Bes-PAC03 and Bes-PAC04 (derived from patient's ascitis in our institute) (Figure 1A). Of note, NRP2 staining was not identified neither on B cell lymphoma cell line, nor breast cancer-cell line MCF-7 (Figure 1A).

Immunohistochemistry studies were then undertaken to determine if NRP2 is expressed at the membrane of various paraffin embedded-human cancer specimen. NRP2 was expressed on 3 out of 10 colon carcinomas, 5 out of 15 breast carcinomas and 4 out of 12 pancreatic carcinomas. Of note, NRP2 was not detected on prostate cancers (n=10) and B cell lymphomas (n=10) (data not shown). Moreover, immunohistochemistry staining showed that NRP2 is expressed at the membrane of human colon carcinoma and breast carcinoma while it is not expressed in non malignant tissues. (Figure 1B).

To study the precise role of NRP2 in cancer progression, we decided to generate colon cancer cell line expressing or not NRP2 using NRP2 gene transfer or NRP2 specific siRNA. Hence, NRP2 was transfected into HT29 and a specific siRNA was used to knock down NRP2 expression in Colo320. Flow cytometry experiments were performed to confirm the modulation of NRP2 expression in HT29 and Colo320 (Figure 2A). NRP2 presence in HT29<sup>ctrl</sup>, HT29<sup>NRP2</sup>, Colo320<sup>siRNA-ctrl</sup>, Colo320<sup>siRNA-NRP2</sup>, was controlled by western blotting (Figure 2B).

### **NRP2 promotes tumor proliferation**

We took advantage of the previous cell lines to study the role of NRP2 on cancer proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo*. Proliferation was monitored using MTT assays. HT29<sup>NRP2</sup> cells transfected with NRP2 showed a superior proliferation rate at 24, 48 and 72h compared to HT29<sup>ctrl</sup> (Figure 3A, upper left panel). Conversely, NRP2 knockdown using specific siRNA, negatively modulated the proliferation of Colo320 tumor cell line (Figure 3B, upper right panel). These experiments showed that NRP2 expression enhances colon cancer cell line proliferation *in vitro*. Since NRPs are VEGF co-receptors, we monitored VEGF-A production in HT29 and Colo320 cultures. These cell lines produced low levels of VEGF-A. Moreover NRP2 expression did not influence VEGF production (Figure 3C, middle left panel). Neutralization of VEGF-A with bevacizumab (50 $\mu$ g/mL) had no impact on cell proliferation, which underlies that NRP2 enhances tumor proliferation by a VEGF independent mechanism (Figure 3D, right panel). Moreover, the expression of NRP2 in HT29 did not modulate VEGFR1 phosphorylation status (data not shown). Similar results were obtained with Colo320 (data not shown). Then, the distribution of the nuclear DNA content within HT29, according to NRP2 expression, was studied by flow cytometry. NRP2 expression was associated with an enhanced number of cells in phase S and with an enhanced hyperploidy (Figure 3E). Collectively, these results showed that NRP2 expression in colorectal cell carcinoma promotes cancer cell proliferation.

### **NRP2 ablation using siRNA inhibits xenograft formation.**

Then, the precise role of NRP2 on cancer progression was characterized *in vivo*. To examine the effect of NRP2 expression on *in vivo* tumor growth, we inoculated equal numbers (1.0 x 10<sup>6</sup> cells per mouse) of HT29<sup>NRP2</sup> or HT29<sup>ctrl</sup> cells subcutaneously into nude mice and assessed tumor incidence and volume. The presence of NRP2 was associated to an enhanced tumorigenicity of HT29<sup>NRP2</sup>. NRP2 transfection in HT29 enhanced tumor growth *in vivo* (Figure 4A). Then, we decided to investigate if NRP2 targeting using specific siRNA could inhibit tumor formation. For this purpose, Colo320 cells were treated with NRP2 targeted siRNA or ctrl siRNA and cultured in a soft agar assay. NRP2 knockdown in Colo320 decreased the number of colonies observed in soft agar experiments (Figure 4B). The influence of NRP2 inhibition using specific siRNA on Colo320 tumorigenicity was confirmed

**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

*in vivo*. While Colo320<sup>siRNA-ctrl</sup> induced tumor engraftment in all mice, NRP2 inhibition using specific siRNA prevented xenograft formation in all mice (Figure 4C).

**NRP2 induces epithelial-mesenchymal transition.**

Epithelial-mesenchymal transition is an important mechanism associated with tumor cells invasiveness and metastasis. In culture, NRP2 transfection conferred to HT29 a fibroblastic-like shape reminiscent of mesenchymal cells, whereas HT29 and HT29<sup>ctrl</sup> cell lines displayed a cuboidal appearance, formed clusters which progressively increased in number, and closely apposed cell-to-cell junctions typical of epithelial cells (Figure 5A). Conversely, HT29<sup>NRP2</sup> cells showed reduced cell-cell contact and loose in part their capacity of adherence compared to HT29<sup>ctrl</sup>.

This observation prompted us to investigate the ability of NRP2 to orchestrate the epithelial-mesenchymal transition.

E-cadherin, was known to play a critical role in the suppression of tumor invasion; its loss of function coincides with increased tumor malignancy. E-Cadherin is a universal epithelial marker that plays a key role in epithelial integrity maintenance and downregulation of its expression is a hallmark of EMT. The transcription factor Snail was shown to be a major repressor of E-cadherin transcription.<sup>10</sup> Accordingly, we evaluated the pattern of E-Cadherin and vimentin expression in colorectal cancer cell lines. The presence of NRP2 in HT29 decreased the expression of E-Cadherin and induced the production of vimentin. This observation was confirmed in Colo320 where specific disruption of NRP2 using siRNA down-regulated vimentin (Figure 5B). Of note, NRP2 transfection in HT29 also led to the decrease of EpCAM expression on HT29 (data not shown). Then we analyzed the expression of EMT-associated markers in HT29<sup>ctrl</sup> and HT29<sup>NRP2</sup> xenografts. Immunohistochemistry analysis revealed that the presence of NRP2 on HT29 was associated with an invasive phenotype. While HT29<sup>ctrl</sup> xenograft reconstituted the morphology of moderate differentiated colon adenocarcinoma, HT29<sup>NRP2</sup> induced less differentiated xenografts with an invasive phenotype (Figure 5C). Immunohistochemistry staining confirmed the EMT induced by NRP2 in HT29 since HT29<sup>NRP2</sup> xenografts lacked epithelial markers such as cytokeratin-20 and E-cadherin and acquired expression of mesenchymal molecules such as vimentin (Figure 5C). Expression of Snail in Colo320<sup>siRNA-ctrl</sup> and Colo320<sup>siRNA-NRP2</sup> cells was analyzed by real time quantitative PCR. Decreased NRP2 expression is indeed associated with a downregulation of

**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF-β1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

Snail expression as well as with a decreased TGF-β1 production. (Figure 5D). These results conformed the direct role of NRP2 in EMT.

**Regulation of TGF-β1 pathway by NRP2.**

TGF-β1 was believed to contribute to the late-stage carcinogenesis by inducing EMT and promoting metastasis.<sup>11</sup> Moreover, NRP1 was recently described as a coreceptor for TGF-β1.<sup>12</sup> A peptide of the b2 domain of NRP1 (RKFK, similar to a thrombospondin-1 peptide, also present in NRP2) activates the latent form of TGF-β1.<sup>12</sup> A recent study indicates that TGF-β1 can induce a mesenchymal phenotype consistent with EMT in some colon cancer.<sup>13</sup> Then, we hypothesized that TGF-β1 pathway is implicated in NRP2-induced EMT.

In response to ligand binding, TGF-β receptors type I and II form tight complexes leading to phosphorylation of Smad2 and Smad3. Phosphorylated Smads interact with cytoplasmic Smad4 and translocate to the nucleus where Smad complex control transcription of target genes through interaction with specific binding motifs in their gene regulatory regions. While the relative functional roles of Smad2/3 remain to be fully delineated, recent studies suggest that the majority of TGF-β1 target genes are controlled through Smad3 dependent transcriptional regulation. Essential roles of Smad2/3 have also been demonstrated in EMT associated with tumor progression models. Hence, we first assessed Smad2/3 activation status according NRP2 expression in HT29 by flow cytometry. Intra-cytoplasmic Smad2/3 phosphorylation was increased in NRP2 expressing tumor cells (Figure 6A). Using confocal microscopy, we could observe that NRP2 expression on HT29 was correlated to a nuclear localization of phospho-Smad2/3 (Figure 6B).

Since Smad-7 inhibits Smad2/3 activation and complex translocation to the nucleus, we decided to analyze the influence of NRP2 transfection on smad7. Western-blot experiments showed that the expression of the TGF-β1 signaling inhibitor Smad7 was repressed in the presence of NRP2 (data not shown).

TGF-β1-treated HT29 acquired a spindle-shaped morphology in line with a potential role of TGF-β1 on EMT phenotype in HT29. Then, the next set of experiments was performed to study the direct effect of NRP2 on TGF-β1-mediated signaling.

Using western blotting experiments, we confirmed that Smad2/3 is phosphorylated in HT29<sup>NRP2</sup> cells without any exposition to exogenous TGF-β1 (Figure 6C). Since HT29 constitutively produce TGF-β1, our results suggest that NRP2 confers to HT29 a constitutive autocrine activation of TGF-β1 signaling, as confirmed by the spontaneous presence of

**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

phosphorylated Smad2/3 in HT29<sup>NRP2</sup> nucleus. Moreover, we could observe that NRP2 enhanced TGF- $\beta$ 1-mediated Smad2/3 phosphorylation in HT29 (Figure 6C). In line with these results, we observed that the presence of NRP2 on HT29 improved the ability of HT29 to proliferate when exposed to TGF- $\beta$ 1 (supplementary Figure 1). NRP2 enhanced the sensitivity of HT29 to the promoter function of TGF- $\beta$ 1.

Whether NRP2-siRNA could reverse the TGF- $\beta$ 1-induced colony formation was then examined. As expected, TGF- $\beta$ 1 enhanced colony formation of cells expressing NRP2 (Colo320<sup>siRNA-ctrl</sup>) whereas it had no effect on Colo320 treated with NRP2 specific siRNA. Exposition of Colo320 to a TGF $\beta$ -R1 kinase inhibitor (SD208) reduced the number of colony observed in Colo320<sup>siRNA-ctrl</sup> cells, while it had no effect on Colo320<sup>siRNA-NRP2</sup> (Figure 6D). These results suggest that NRP2 expression leads to TGF- $\beta$ 1 constitutive signaling activation and sustain a possible role of TGF- $\beta$ 1 in EMT. The oncogenic properties of NRP2 and its direct involvement in EMT open new perspectives to design specific targeted therapeutics.

## **DISCUSSION**

There is increasing evidence that epithelial-mesenchymal transition (EMT) is involved in cancer progression. For most carcinoma, cancer progression is correlated with a loss of epithelial differentiation and a shift towards a mesenchymal phenotype. This process, referred to as EMT, enhances motility and invasiveness of many cell types and is often considered a prerequisite for tumor infiltration and metastasis. The targeting of specific molecules involved in EMT is of particular interest to prevent cancer progression. However, such specific therapies interfering with the EMT process are still missing. Neuropilins were initially described as kinase-deficient neuronal patterning receptors recognizing class-3 semaphorin ligands. Indeed, neuropilins have emerged as regulators of neuronal growth cone collapse and cell motility mediated by semaphorins during embryogenesis<sup>1</sup> leading us to explore the hypothesis of their involvement in EMT.

Their ability to function as VEGFR co-receptors resulted in the identification of their implication in vascular and lymphatic sprouting controlled by VEGF. The role of NRPs in vascular development regulation supported their potential involvement in cancer neo-angiogenesis. Blocking NRP1 in mice bearing NRP1 negative cancers resulted in a vascular-specific anti-tumoral activity.<sup>14</sup> Based on the ability of NRP2 to bind VEGF-A, C and D, studies were conducted to investigate the role of NRP2 in cancer neovascularization. Neutralization of NRP2 in different tumor models led to tumor lymphangiogenesis inhibition.<sup>5</sup>

In addition to their expression on neovessels, NRPs have been detected on several human tumors. The wide expression of NRPs among different human tumors suggested a potential role of this molecular network in cancer progression. Although the role of NRP1 in cancer was largely demonstrated<sup>15</sup>, the precise contribution of NRP2 in oncogenesis was only recently considered. A role for NRP2 in cancer cells has been initially suggested in colon cancer. The first investigations showed that NRP2 is expressed on human colon cancer cells while undetectable in uninvolved adjacent mucosa.<sup>8</sup> NRP2 expression was shown to promote the malignant phenotype of colon cancers<sup>8</sup>, pancreatic cancers<sup>16</sup>, and breast cancers<sup>17</sup>. Particularly, NRP2 knock-down hampered anchorage-independent growth in several tumor models.<sup>8,16</sup>

**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

Our results first confirmed the role of NRP2 in cancer proliferation *in vitro* and xenograft formation *in vivo* (Figures 3 and 4). We also extended the understanding of NRP2 oncogenic functions. We have shown that NRP2 is a critical component of epithelial to mesenchymal transition. Analysis of NRP2 transfected cell lines and NRP2 expressing xenografts established that NRP2-expressing tumor cells displayed an immunohistochemical phenotype of EMT characterized by the loss of E-Cadherin and an increase of vimentin expression (Figure 5).

EMT is a pivotal component of cancer invasiveness associated with loss of epithelial differentiation and gain of mesenchyme-like capabilities. Loss of homophilic cell adhesions and polarity is widely associated with loss of functional E-cadherin and acquisition of proteins regulating cytoskeletal functions such as vimentin. A direct role of vimentin in cancer invasiveness, when co-expressed with keratins, was suggested in breast carcinoma cell lines.<sup>18</sup> The expression of vimentin in invasive colorectal carcinoma was not thoroughly investigated. Brabletz T *et al* observed an expression of vimentin in colorectal cancer cell lines and dedifferentiated human colorectal carcinoma.<sup>19</sup> The association between vimentin and EMT in colorectal cancer cell was confirmed in a recent study.<sup>13</sup> Of note, in the latter study, TGF- $\beta$ 1-mediated EMT directly drives vimentin production in colon cancer cells.<sup>13</sup>

In line with these reports, our results outline a correlation between vimentin expression and mesenchymal phenotype acquisition in colorectal cancers. Furthermore, from these data it is postulated that NRP2 expression might be an early component of EMT promoting cadherin switch and acquisition of vimentin expression.

From our results it also appears that NRP2 induction is correlated to the transcription of the E-Cadherin repressor snail, suggesting a direct role of NRP2 in EMT program acquisition (Figure 5D). TGF- $\beta$ 1 signaling induces an EMT state in several cancer models.<sup>20-22</sup> The capacity of TGF- $\beta$ 1 to drive the snail transcription factor<sup>23</sup> as well as its ability to promote vimentin expression<sup>13</sup>, suggest the hypothesis of a possible interactions between TGF- $\beta$ 1 signaling and NRP2-mediated EMT.

A peptide (RKFK) of the b2 domain of NRP1, confers to this receptor the ability to bind and activate TGF- $\beta$ 1.<sup>12</sup> Comparison of the amino acid sequences of NRP1 and NRP2 revealed that RKFK peptide is a conserved sequence of the extracellular part of these receptors.

**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

These observations prompted us to investigate the role of NRP2 on TGF- $\beta$ 1 signaling. Our work highlights a cross-talk between NRP2 and TGF- $\beta$ 1 signaling to promote cancer progression.

We could observe that NRP2 gene transfer induce a constitutive expression of activated Smad2/3 and a nuclear localization of Smad2/3 complexes in HT29. Moreover, NRP2 expression on colon cancer cell lines promoted their capacities to respond to TGF- $\beta$ 1.

The level and differential expression of phospho-Akt were similar between HT29 and HT29NRP2 (data not shown). Therefore, it is unlikely that Smad-independent TGF- $\beta$ 1 pathway is implicated in NRP2-mediated EMT promotion. The data presented in the figure 6 of the present manuscript established a direct association between NRP2 expression, Smad2/3-phosphorylation and nuclear localization. Of note, treatment of Colo320 cell lines with SD208, a TGF $\beta$ -R1 kinase inhibitor, totally abrogated the effect of TGF- $\beta$ 1 on colony formation in soft agar culture experiments, suggesting the requirement of TGF $\beta$ -R1 in NRP2-promotion of TGF-  $\beta$ 1 signaling (Figure 6D).

Moreover, a critical function in cancer cell survival was previously attributed to NRP2 in colon cancer cells.<sup>8</sup> In this model, NRP2 sustains VEGFR1 activity leading to constitutive phosphorylation of Akt and VEGF-mediated survival. Our results suggest the presence of an alternative signaling pathway governed by NRP2 and triggering the Smad-dependent TGF- $\beta$ 1 signaling to initiate the EMT process. The precise role of the TGF- $\beta$ 1-activated Smads in EMT is complex. While activated Smad2/3 complexes promote EMT, the inhibitory Smad7 prevents the transition of cancer cells towards a mesenchymal phenotype.<sup>21</sup> Interestingly, we observed a reduced level of Smad7 in colon cancer cells following NRP2 gene transfer (data not shown). This molecular feature might account for the enhanced colony and xenograft-formation capacities associated with NRP2 expression.

These results suggest that NRP2 fulfill all the criteria of a therapeutic target to disrupt multiple oncogenic functions in solid tumors.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

Human cell lines HT29, Colo320, SW620, MCF7, Caki, A498 were purchased from the American Type Cell Culture Collection and were cultured in RPMI1640 or DMEM (Lonza, Paris, France) supplemented with 10% heat inactivated endotoxin free fetal calf serum (FCS), (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The Bes-PAC03 and Bes-PAC04 (Pancreatic Adeno-Carcinoma) cell lines were originally isolated from ascitic fluids derived from two patients with pancreatic adenocarcinomas, in our university hospital. R3III cell line was kindly provided by Nathalie Labarriere, Inserm (Nantes, France). Jijoye (Human Burkitt Lymphoma) was provided by Diaclone (Besançon, France). Cell lines used in this study were authenticated using DNA profiling (short tandem repeats analysis), in line with ATCC's recommendations.

DNA STR profiling is as indicated below:

	<b>D7S820</b>	<b>CSF1PO</b>	<b>TH01</b>	<b>D13S317</b>	<b>D16S539</b>	<b>vWA</b>	<b>TPOX</b>	<b>D5S818</b>
<b>Jijoye</b>	8,10	10,11	7,9	12	10,11	15,19	6,8	12
<b>SW620</b>	8,9	13,14	8	12	9,13	16	11	13
<b>Caki-1</b>	8,12	10,11	6,8	11,12	12	15,17	8,11	11,12
<b>MCF-7</b>	8,9	10	6	11	11,12	14,15	9,12	11,12
<b>A498</b>	10,11	11,12	6, 9,3	12	12	18	8,11	11,13
<b>Colo320</b>	9,12	11	8,9	11	11,12	15,18	8,9	12
<b>HT29</b>	10	11,12	6,9	11,12	11,12	17,19	8,9	11,12

### **pcDNA Expression plasmids**

The influence of NRP2 on colon cancer cell progression was assessed by transferring NRP2 gene in the HT29 cell line. We generated HT29<sup>NRP2</sup> cell lines using two expression plasmids encoding hNRP2 (pcDNA3.1-NRP2, kindly provided by M. Klagsbrun) and pCMV6-XL5-NRP2 (purchased from Origene (SC122534, Origene, Rockville, MD, USA). Control HT29 cells were generated using pcDNA3.1 or pCMV6-XL5 vectors.  $1.5 \times 10^6$  HT29 cells were seeded in a 60mm<sup>3</sup> flask in 4mL medium and incubated for 24h. Then, cells were transfected with 1 $\mu$ g of pcDNA3.1-NRP2 or pCMV6-XL5-NRP2 expression vectors or control vectors using the Effectene kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instruction. Of note, cells transfected with pcDNA3.1 vectors were selected with 0.8mg/mL of geneticin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 48h following the transfection. Flow cytometry and western blotting experiments were performed to identify NRP2 expressing cells (C9, Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany).

### **Small Interfering RNA**

Using the Ambion siRNA web design tool, we identified two potential NRP2-specific target sequences. The sense (5'-AAA GGC TGG AAG TCA GCA CTA ATT T-3') and anti-sense (5'-AAA AAT TAG TGC TGA CTT CCA GCT T-3') sequences were annealed and cloned into the BbsI site of the 3' LTR of pFIV-H1/U6 vector according to manufacturer's instructions (System Biosciences, Mountain View, CA). Scrambled siRNA were included as control (5'-AAAGGAGGGGCATGCCACGTTGG-3' and 5'-AAAACCAACGTGGCATGCCCTC-3'). Sequences were confirmed by NIH BLAST analysis to have no substantial homology to sequences in other vertebrate genes. Lentiviral supernatant production and subsequent infection of Colo320 cell line were performed according to manufacturer's instructions (System Biosciences, Mountain View, CA).

### **Flow cytometry**

For surface NRP2 detection,  $2.10^5$  cells were incubated with anti-human NRP2 (C9, Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Alexafluor488-labelled secondary antibodies were purchased from Fluoprobes (Interchim, Montluçon, France). Ten thousands cells from each sample were evaluated for fluorescence detection using BD FACScanto cytometer.

### **Cell Proliferation Assay**

Cell proliferation in vitro was analyzed with the tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphentyltetrazolium bromide (MTT). The yellow dye MTT is reduced to a blue formazan product by respiratory enzymes that are active only in viable cells, making the amount of color change indicative of cell proliferation. Briefly, 4000 cells per well were seeded in 96-well micro-plates containing 100  $\mu$ L of medium per well. For analysis, 10  $\mu$ L of MTT substrate (of a 5 mg/mL stock solution in phosphate-buffered saline) was added to each well, and the plates were let to standard tissue incubator conditions for an additional 2 hours. Cells were solubilized in 200  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide, and colorimetric analyses were performed (wavelength, 570 nm). The plates were assayed every 24 hours for the next 3 consecutive days.

### **ELISA assay**

Cells were incubated in RPMI or DMEM-1% FCS for 24h. Then cells were counted and 10000 cells per well were seeded in 96-microplate in 200 $\mu$ L RPMI or DMEM-0.1% FCS for 24h. VEGF production was assessed on supernatants using human VEGF Elisa kit (Strathmann Biotec, Hamburg, Germany).

### **Flow Cytometry Analysis of DNA Content**

Cells were harvested by trypsinization, washed with ice-cold PBS, fixed in 70% ethanol. Prior to DNA analysis, cells were stained with 50 $\mu$ g/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and 2 $\mu$ g/mL DNase-free RNase (Sigma-Aldrich, Lyon, France) for 15 min at 37°C in the dark. DNA content was measured using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and analyzed with the CellQuest program.

### **Colony formation assay**

Effect of NRP2 expression on colony formation in vitro was evaluated by soft agar colony-formation assay. 24-well plates were coated with 500 $\mu$ L of medium containing 2% agarose, and 4000 cells were seeded in 500 $\mu$ L of 2% agarose medium. Cells were incubated at standard conditions and photos were taken after 10 days of culture.

### **Laser confocal microscopic analysis**

$2.10^5$  cells were incubated at 37°C overnight on glass chamber slides Labteck®. The medium was replaced with 3.7% wt/vol paraformaldehyde 20min at 4°C for fixation. Cell membranes were permeabilized with 0.1% Triton X100 in PBS for 15min at 4°C. Cells were washed with PBS and PBS +0.5% FCS, then stained with anti-human pSmad2/3 (Ser423/425, Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluted in 0.5% FCS in PBS at 4°C for 3 hours. Cells were washed with PBS and incubated with FITC-secondary antibody (Fluoprobes, Interchim, Montluçon, France) diluted in PBS with 0.5% SVF at 4°C for 2 hours. Cells were washed and incubated with Dapi for few seconds. Stacks of confocal images were collected with an Olympus FV1000 laser scanning confocal microscope.

### **Cell Treatments**

The influence of NRP2 on TGF- $\beta$ 1- mediated EMT was assessed using human recombinant TGF- $\beta$ 1 (Peprotech, Neuilly-Sur-Seine, France). Treatment by TGF- $\beta$ 1 was realized by treating cells by 10ng/mL TGF- $\beta$ 1 for 24h. TGF- $\beta$ 1 signaling was inhibited using SD-208 (TGF $\beta$ R1 kinase inhibitor) diluted in DMSO and used at 1 $\mu$ M (Sigma-Aldrich, Lyon, France). In some experiments 50 $\mu$ g/mL of bevacizumab were used to inhibit VEGF-A.

### **Western Blot Analysis**

Briefly, after two washing steps, human colon adenocarcinoma cell lines were harvested and solubilized in 100 $\mu$ L of 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% v/v NP40, 0.5% m/v Deoxycholate Na, 2 mM EDTA, 2 mM NaF, 1 mM Vanadate and one complete Mini protease Inhibitor Cocktail Tablet (Complete Mini EDTA Free, per 10mL of lysis buffer, Roche, France). 30 $\mu$ g of whole-cell lysates were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes by electroblotting. All membranes were probed with antibodies at a concentration of 1:500. Antibodies used were as follows: anti-NRP2 (C9, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-Smad2/3 (R&D System, Lille, France), anti-vimentin, anti-Ecadherin and anti-pSmad2 (all from Cell Signaling Technology, Danvers, USA). As a loading control all membranes were reprobbed for  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich, Lyon, France) or anti-histone H1 (Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). All antibodies were diluted in

**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF-β1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

Trisbuffered saline and 0.1% (v/v) Tween-20 containing dried milk. Membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, and antibody-bound proteins were visualized by chemiluminescence.

**Xenograft experiments**

Nude mice were obtained from Janvier (Le Genest St Isle, France), and maintained in our animal facility according to the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines.  $1 \times 10^6$  cells of different cell lines (HT29<sup>ctrl</sup>, HT29<sup>NRP2</sup>, Colo320<sup>si-RNA-NRP2</sup> and Colo320<sup>siRNA-ctrl</sup>) resuspended 100μL of PBS per mouse were inoculated subcutaneously in nude mice and tumor growth was monitored biweekly in each group. Tumor volume was calculated by the formula  $V = 1/2 a \times b^2$ , where  $a$  is the longest tumor axis, and  $b$  is the shortest tumor axis. When tumors reached 1cm in diameter, each tumors were fixed in formol.

**Histopathologic Analysis and Immunohistochemical Staining of Tissues**

Tissue samples, obtained from xenografts were fixed in 4% formalin and paraffin embedded. Then, blocks were cut serially at 4-μm thickness. A standard immunohistochemical technique was performed using a Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona) immunostainer with the following primary antibodies : anti E-cadherin (Zymed, San-Francisco, USA), anti-vimentin (Zymed, San-Francisco, USA), anti-cytokeratin-20 (Zymed, San-Francisco, USA) and rabbit anti-NRP2 antibody (H-300, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany).

**Real Time-quantitative PCR (RT-qPCR).**

Total RNA were extracted using Kit RNeasy mini (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed using random hexamers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Rockville, MD, USA). Duplicate samples were subjected to RT-qPCR. mRNA were quantified using primers listed below : NRP2 (Hs00187290\_m1), NRP1 (Hs01546496\_m1), Snail1 (Hs001955991\_m1), TGF-β1 (Hs 00171257\_m1) (Applied Biosystems).

ABL mRNA from each sample was quantified as an endogenous control of internal RNA. Relative mRNA expression was calculated using the Delta-Delta-Ct method and untreated cells were used as calibrator.

**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

### **Statistical analysis**

Results are expressed as the mean plus or minus the standard error of the mean (SEM). Group comparisons were performed using Student *t* test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

**Conflict of Interest:**

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments:**

C.G. has received a fellowship from the “ANRT: Agence Nationale pour la Recherche Technologique”; R.B. has received a fellowship from the Conseil Regional de Franche Comté. This work has been supported by the “Ligue contre le cancer, comité du Doubs”, and by the University Hospital of Besançon (Research grant API-CHU Besançon 2008).

## REFERENCES :

1. He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997;90:739-51.
2. Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Tashiro F, Niwa H, Miyazaki Ji J, Hirota S, Kitamura Y, Kitsukawa T, Fujisawa H, et al. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3657-62.
3. Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herault J.P, Neufeld G, Savi P. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* 2006;108:1243-50.
4. Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takashima S, Klagsbrun M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* 2002;85:357 - 68.
5. Caunt M, Mak J, Liang WC, Stawicki S, Pan Q, Tong RK, Kowalski J, Ho C, Reslan HB, Ross J, Berry L, Kasman I, et al. Blocking Neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 2008;13:331-42.
6. Liu BP, Strittmatter SM. Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:619-26.
7. Cai H. B, Reed R. R. Cloning and characterization of neuropilin-1 interacting protein : A PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J. Neurosci.* 1999;19:6519-27.
8. Gray MJ, Van Buren G, Dallas NA, Xia L, Wang X, Yang AD, Somcio RJ, Lin YG, Lim S, Fan F, Mangala LS, Arumugam T, et al. Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver . *J Natl Cancer Inst* 2008;100 109 - 20.
9. Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:2153-60.
10. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76-83.
11. Kasai H, Allen J. T, Mason R. M, Kamimura T, Zhang Z. TGF-B1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research* 2005;6:56.
12. Glinka Y, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 2008;84:302-10.
13. Pino MS, Kikuchi H, Zeng M, Herraiz MT, Sperduti I, Berger D, Park DY, lafrate AJ, Zukerberg LR, Chung DC. The epithelial to mesenchymal transition is impaired in colon cancer cells with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2009.
14. Geretti E, Shimizu A, Klagsbrun M. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008;11:31-9.
15. Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1099-107.
16. Dallas NA, Gray MJ, Xia L, Fan F, van Buren G 2nd, Gaur P, Samuel S, Lim SJ, Arumugam T, Ramachandran V, Wang H, Ellis LM. Neuropilin-2-mediated tumor growth and angiogenesis in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:8052-60.
17. Yasuoka H, Kodama R, Tsujimoto M, Yoshidome K, Akamatsu H, Nakahara M, Inagaki M, Sanke T, Nakamura Y. Neuropilin-2 expression in breast cancer: correlation with lymph node metastasis, poor prognosis, and regulation of CXCR4 expression. *BMC Cancer* 2009;7:220.
18. Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Trevor KT. Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol.* 1997;150:483-95.

**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

**19. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:10356-61.**

**20. Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, Dijke P. TGF- $\beta$  type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. J Cell Sci 1999;112:4557-68.**

**21. Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A. TGF- $\beta$  and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. Mol Biol Cell. 2005;16.**

**22. Nawshad A, LaGamba D, Hay ED. Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). Arch Oral Biol 2004;49:675-89.**

**23. Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor  $\beta$ -1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. J Biol Chem 2003 278:21113-23.**

## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** *A*, Flow cytometry analysis of NRP2 expression in human cancer cell lines. (green : anti-NRP2 red : isotype) . *B*, Assessment of NRP2 expression in human colon tissues and breast tissues (brown). Formalin-fixed paraffin-embedded tissues were incubated overnight at room temperature with anti-human NRP2 antibody. Representative micrographs were taken at an original magnification x500 or x1000; immunohistochemistry studies showed that NRP2 is expressed at the membrane of human colon carcinoma and breast carcinoma while it is not expressed in non malignant tissues.

**Figure 2.** Transfected cells were analyzed for transgene expression by flow cytometry analysis (*A*) or by western blotting (*B*)

**Figure 3.** *A, B*, NRP2 mediates proliferation in vitro. MTT analysis of growth rates of control cells, cells over-expressing NRP2 or cells with reduced NRP2 expression after 24, 48 and 72h of culture. Data represent means of triplicates plus or minus the standard error (SE). (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). *C*, Analysis of secretion of VEGF165 by transfected cells. Non significant difference in VEGF secretion was observed by ELISA VEGF analysis. *D*, Bevacizumab treatment (50 $\mu$ g/mL, 48h) fails to modify growth rate in HT29<sup>ctrl</sup> and in HT29<sup>NRP2</sup>. *E*, Flow cytometry analysis of DNA content of HT29<sup>ctrl</sup> and HT29<sup>NRP2</sup>. Data represent results of a representative experiment out of 3 expressed as the mean of triplicate assays (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

**Figure 4.** NRP2 positively influences cell tumorigenesis in vivo. HT29<sup>ctrl</sup>, HT29<sup>NRP2</sup>, Colo320<sup>siRNA-NRP2</sup> or Colo320<sup>siRNA-ctrl</sup> were injected s.c in nude mice (n=5). Tumor volume was calculated by the formula  $V = 1/2 a \times b^2$ , where *a* is the longest tumor axis, and *b* is the shortest tumor axis. Data reported are the mean average tumor diameter  $\pm$  SEM. *A*, NRP2-expressing cells HT29 significantly form bigger tumors in xenograft model than control cells. (\*\*,  $P < 0.01$ ). *B*, Colo320 cells lacking neuropilin-2 form few colony in soft agar test, compared to control cells. *C*, Mice receiving Colo320<sup>siRNA-NRP2</sup> do not develop tumor, even after 3 months.

**Figure 5.** *A*, NRP2 induces EMT. *A*, HT29<sup>NRP2</sup> take a fibroblastic-like shape whereas HT29<sup>ctrl</sup> has a cuboidal appearance. *B*, Transfected cells were analyzed for expression of epithelial and

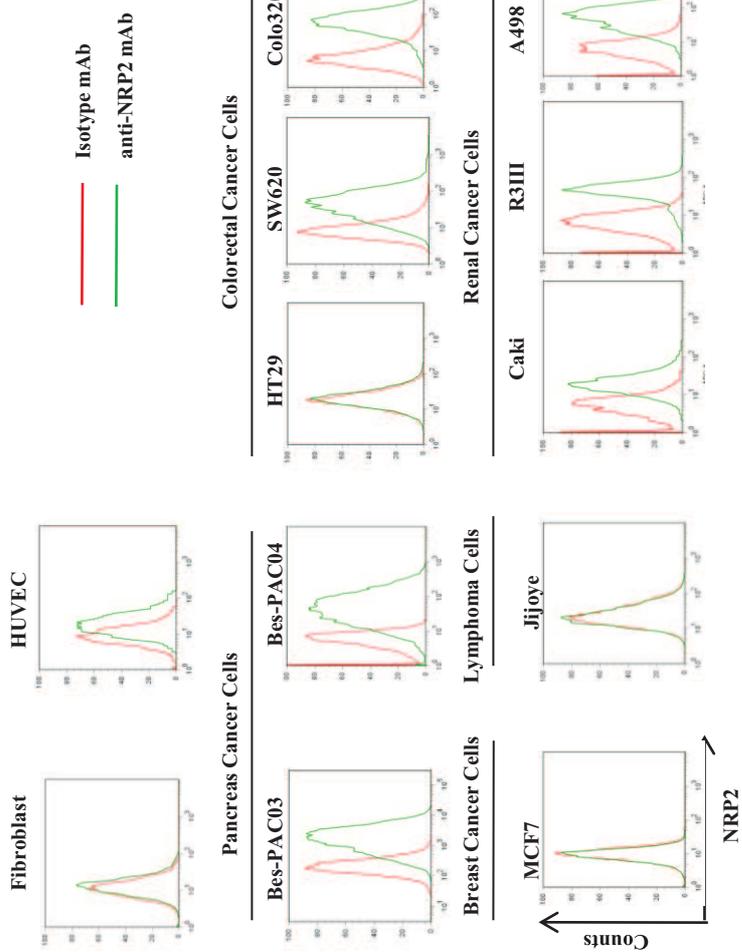
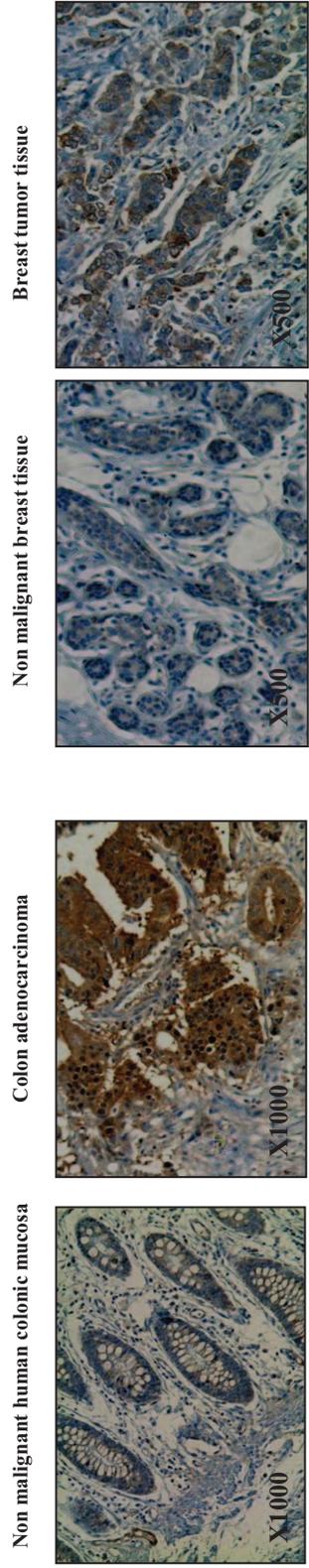
**Camille Grandclément et al. Neuropilin 2 expression promotes TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells.**

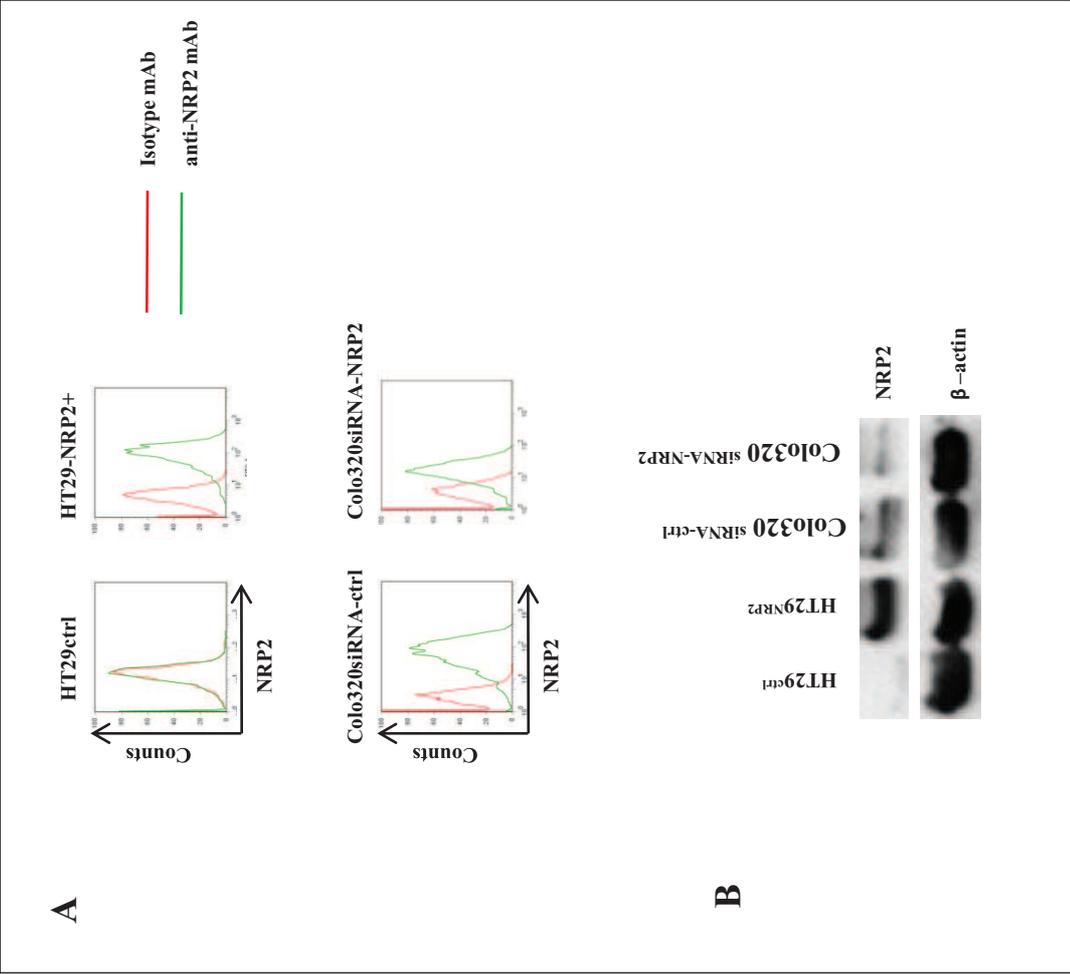
mesenchymal markers (respectively E-Cadherin and vimentin) by western-blotting. The presence of neuropilin-2 in HT29 decreased the expression of E-Cadherin and induced the production of vimentin. *C*, Frozen sections of the isolated tumors from HT29<sup>ctrl</sup> and HT29<sup>NRP2</sup> xenografts were subjected to immunohistochemical staining with anti-cytokeratin-20, anti-Ecadherin, anti-vimentin antibody and H&E staining. H&E staining shows that HT29<sup>NRP2</sup> invade smooth muscle (sm=smooth muscle) as indicated by arrows on photo contrary to HT29<sup>ctrl</sup> which shows a locally invasion. HT29<sup>NRP2</sup> xenografts lacked epithelial markers such as cytokeratin-20 and E-cadherin and acquired expression of mesenchymal molecules such as vimentin *D*, Evaluation of TGF $\beta$ 1 secretion, neuropilins and Snail expression by QRT-PCR analysis. Decreased NRP2 expression is indeed associated with a downregulation of Snail expression and with a decreased TGF- $\beta$ 1 production.

**Figure 6.** *A*, NRP2 enhances phosphorylation of Smad2/3. Flow cytometric analysis shows that Smad2/3 is more phosphorylated in NRP2 expressing cells HT29<sup>NRP2</sup> than in NRP2 lacking cells HT29<sup>ctrl</sup>. (green: anti-pSmad2/3, red: isotype). *B*, Confocal staining shows that phosphorylated Smad2/3 (green) nuclear expression (blue, Dapi) is increased in HT29<sup>NRP2</sup> cells compared to HT29<sup>ctrl</sup>. (lower panel) *C*, TGF- $\beta$ 1 pathway is constitutively activated in NRP2 expressing cells. Treatment by TGF- $\beta$ 1 increased the phosphorylation of smad2/3 in the nucleus more importantly in HT29<sup>NRP2</sup> than in HT29. *D*, TGF- $\beta$ 1 enhances colony formation of cells expressing NRP2 (Colo320<sup>siRNA-ctrl</sup>) whereas it has no effect on NRP2 downregulating cells (Colo320<sup>siRNA-NRP2</sup>). Treatment of Colo320<sup>siRNA-ctrl</sup> with SD-208 (a TGF  $\beta$ -R1 kinase inhibitor) reduces colony formation of these cells.

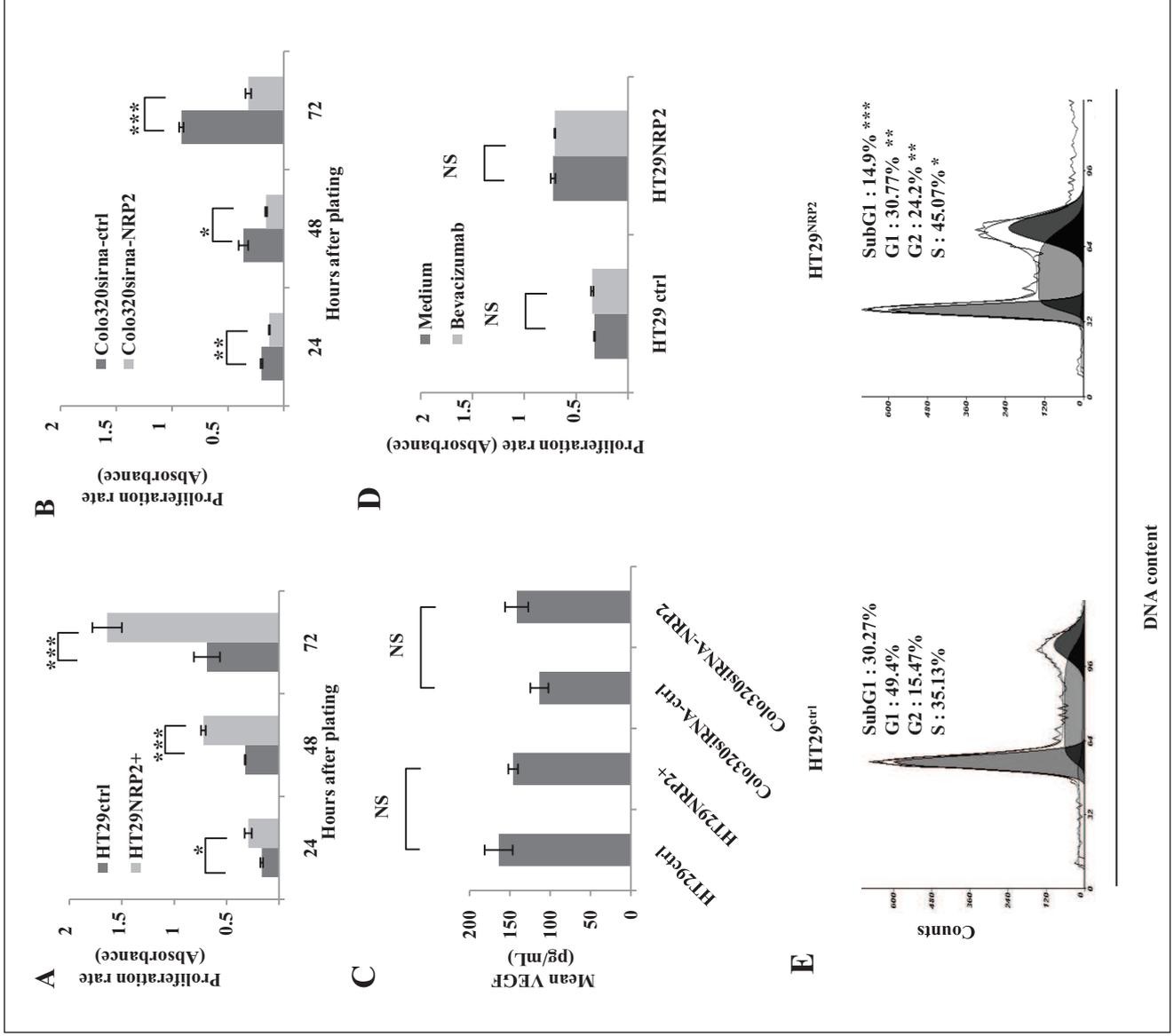
**Supplementary Figure 1.**

MTT assay shows that human recombinant TGF- $\beta$ 1 enhances dose-dependantly proliferation of NRP2 expressing cells (HT29<sup>NRP2</sup>) after 72h of cell culture. % of proliferation compared to untreated cells was reported on graph. Results are expressed as the mean of triplicate assays of a representative experiment.

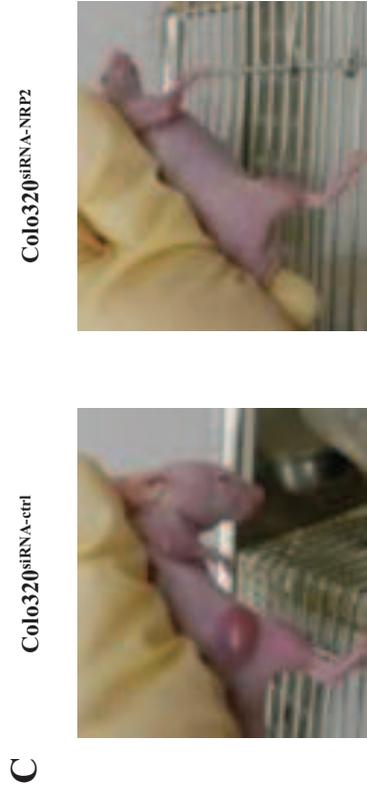
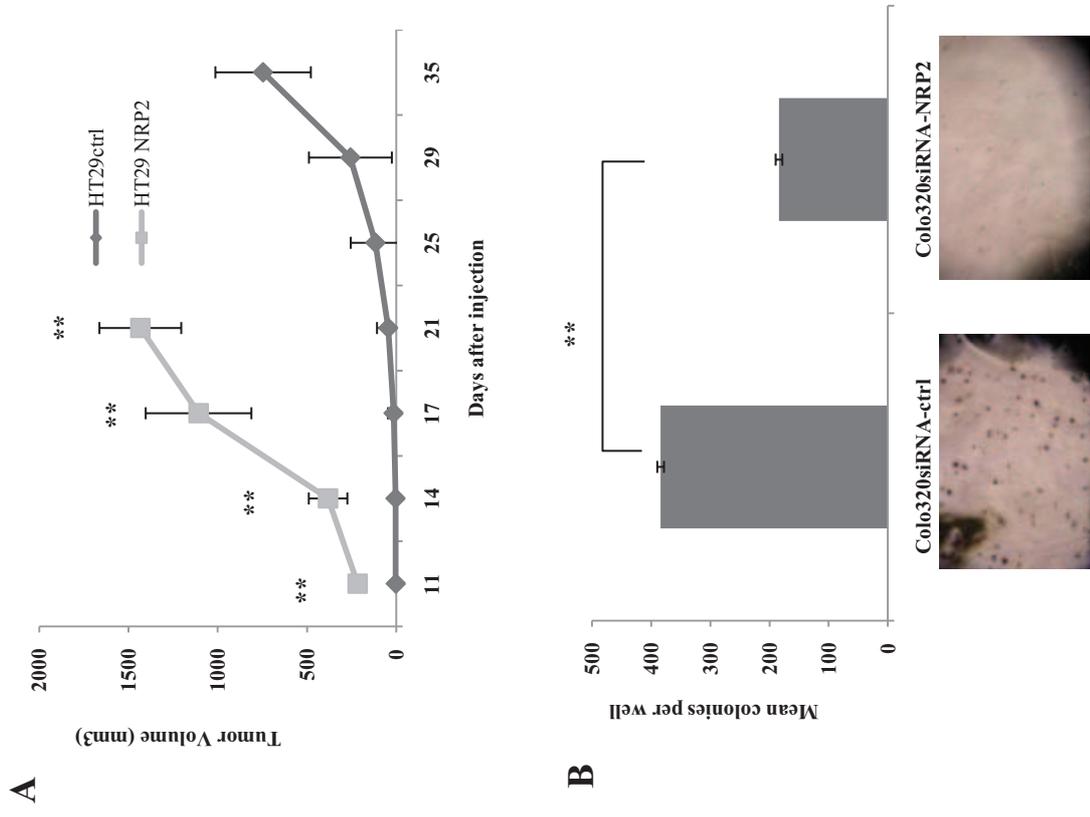
**A****B****Fig. 1**



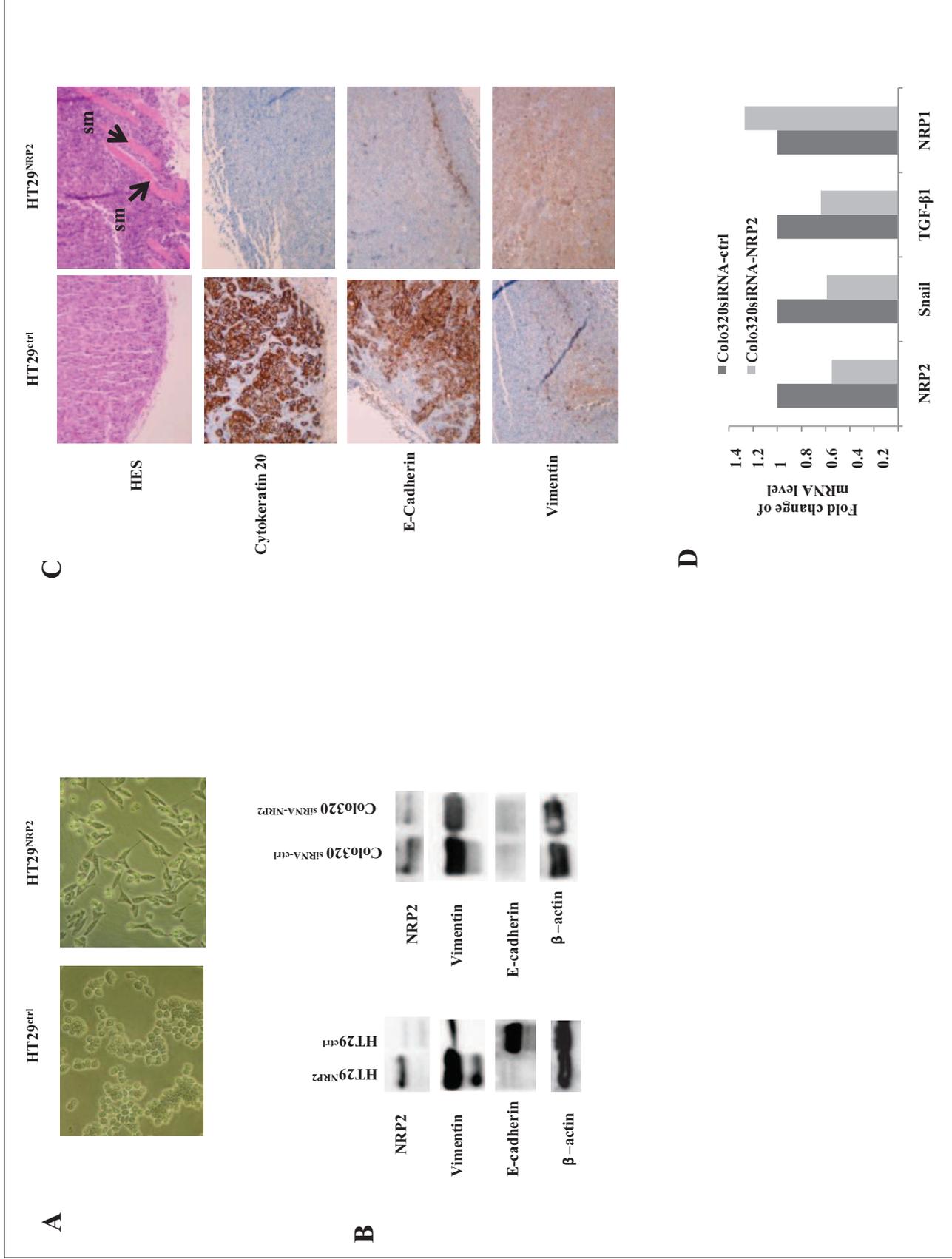
**Fig. 2**



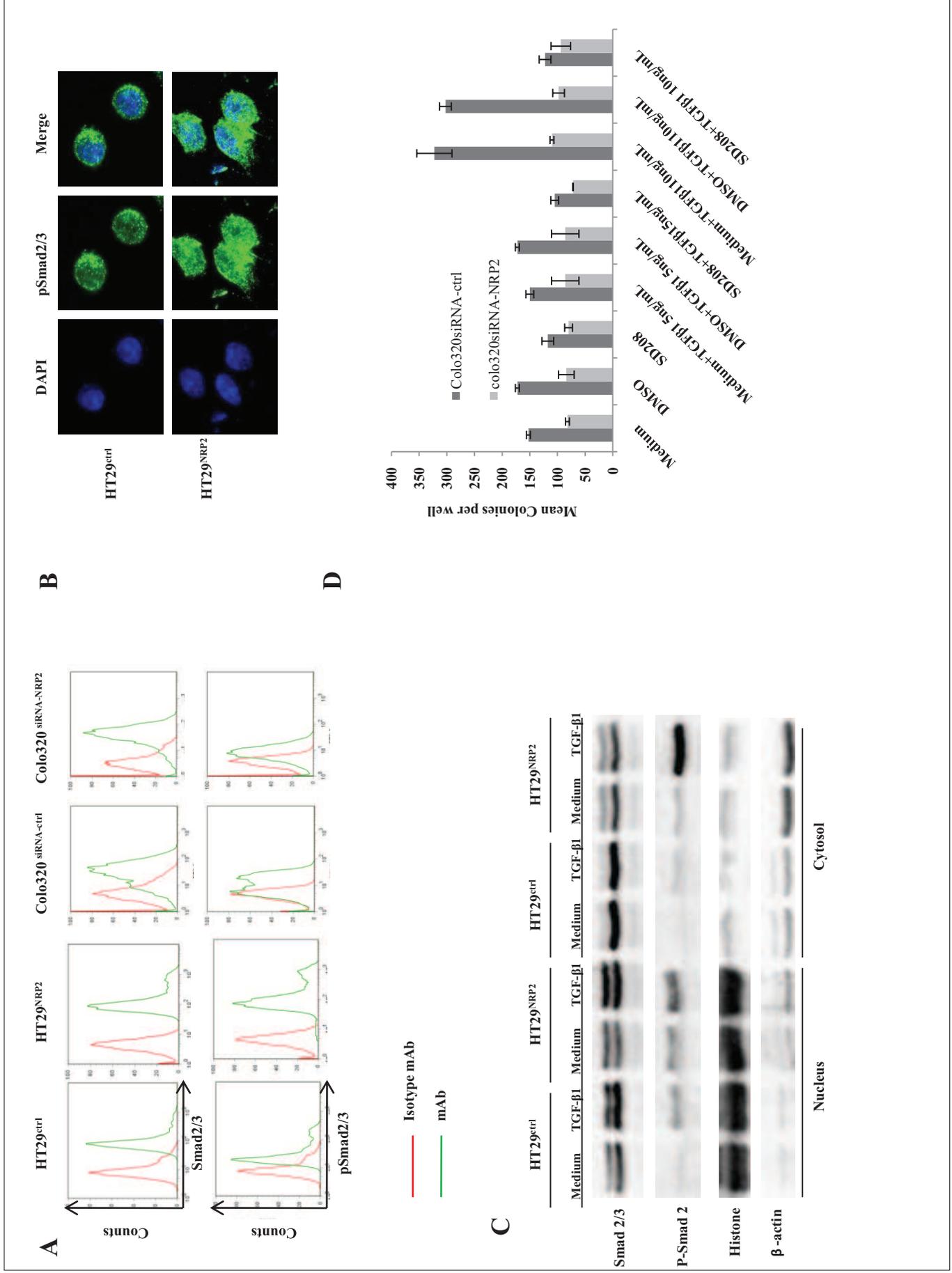
**Fig. 3**



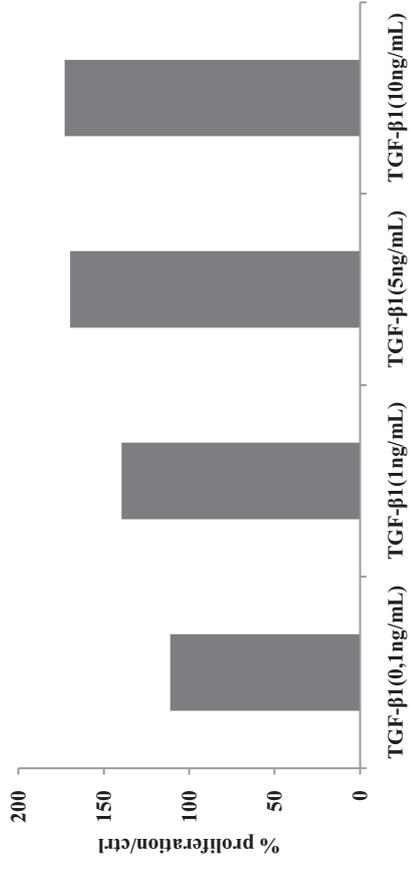
**Fig. 4**



**Fig. 5**



## HT29-NRP2



Supplementary Figure 1

**Bedel R**, Borg C, Saas F. Biothérapies modulant les réponses immunitaires anti-tumorales : Utilisations thérapeutiques des ligands agonistes des récepteurs TOLL et des anticorps neutralisant CTLA-4. *Les thérapies ciblées, Editions Springer. 2008, 169-195.*

### **CTLA-4 et Toll-like récepteurs : de nouvelles cibles en immunothérapie**

R. Bedel, C. Borg et P. Saas

#### **Résumé**

Plusieurs données cliniques suggèrent que la modulation des réponses immunitaires peut être une stratégie anti-tumorale efficace. L'administration de BCG est reconnue comme un traitement efficace des cancers superficiels de la vessie. Par analogie avec les vaccinations contre certains pathogènes intracellulaires, des protocoles de vaccination ont utilisé le BCG comme adjuvant et permis l'obtention de résultats cliniques intéressants. L'allogreffe de cellules hématopoïétiques a montré de longue date sa capacité à éradiquer des maladies leucémiques réfractaires aux traitements conventionnels. Récemment, l'introduction des anticorps monoclonaux dans l'arsenal thérapeutique de l'oncologie médicale et de l'hématologie a étayé l'importance du système immunitaire anti-tumoral. Ces résultats ont motivé un plus ample développement des biothérapies favorisant les réponses immunitaires anti-tumorales. Ainsi, nous aborderons ici les données fondamentales et cliniques concernant l'utilisation de ligands agonistes des récepteurs de la famille TOLL et des anticorps neutralisant la molécule CTLA-4.



# CTLA-4 et Toll-like récepteurs : de nouvelles cibles en immunothérapie

R. Bedel, C. Borg et P. Saas

Plusieurs données cliniques suggèrent que la modulation des réponses immunitaires peut être une stratégie anti-tumorale efficace. L'administration de BCG est reconnue comme un traitement efficace des cancers superficiels de la vessie. Par analogie avec les vaccinations contre certains pathogènes intracellulaires, des protocoles de vaccination ont utilisé le BCG comme adjuvant et permis l'obtention de résultats cliniques intéressants. L'allogreffe de cellules hématopoïétiques a montré de longue date sa capacité à éradiquer des maladies leucémiques réfractaires aux traitements conventionnels. Récemment, l'introduction des anticorps monoclonaux dans l'arsenal thérapeutique de l'oncologie médicale et de l'hématologie a étayé l'importance du système immunitaire anti-tumoral. Ces résultats ont motivé un plus ample développement des biothérapies favorisant les réponses immunitaires anti-tumorales. Ainsi, nous aborderons ici les données fondamentales et cliniques concernant l'utilisation de ligands agonistes des récepteurs de la famille TOLL et des anticorps neutralisant la molécule CTLA-4.

## Introduction

Le système immunitaire comprend l'ensemble des mécanismes biologiques qui agissent conjointement pour protéger l'organisme des agressions pathogènes extérieures (virales, bactériennes, parasitaires ou fongiques). Cette protection est possible grâce à la discrimination entre les cellules saines de l'individu (le soi) et les cellules infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme (le non soi). L'immunité peut être divisée en deux compartiments distincts, l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée comprend les barrières biologiques (peau, muqueuses), les systèmes du complément et de l'inflammation et les cellules lymphocytaires à cytotoxicité naturelle (NK), macrophages, cellules dendritiques et autres lymphocytes à TCR invariants. L'immunité adaptative

est composée des lymphocytes T et B. Elle est spécifique de l'antigène qui a déclenché la réponse immunitaire et elle induit une mémoire à long terme qui protège plus efficacement l'organisme lors d'une seconde infection. Une coopération cellulaire et moléculaire entre ces deux compartiments est requise pour la genèse d'une réponse immunitaire efficace.

Les grandes étapes de l'initiation des réponses immunitaires sont maintenant bien connues. Les cellules dendritiques (DC) présentes en périphérie reconnaissent et captent des protéines exogènes. Elles internalisent et clivent ces protéines en peptides, puis les présentent à leur surface associés aux molécules du CMH de classe I ou II. Dans un contexte inflammatoire, les cytokines et chimiokines produites par les cellules du compartiment inné et les signaux de danger perçus par la DC vont déclencher un processus de maturation. Les DC migrent dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) les plus proches (ganglions, rate), pour initier l'activation des lymphocytes T ou B naïfs. Cette activation nécessite 3 signaux différents. Tout d'abord, la reconnaissance spécifique entre le complexe CMH/peptide et le TCR, récepteur spécifique du lymphocyte T. Cette première reconnaissance déclenche la phosphorylation de la partie intra-cytoplasmique du TCR, le recrutement de ZAP70 et des kinases de la famille syk et lck. Le signal n'est cependant pas suffisant pour permettre une activation efficace du lymphocyte. Des signaux de costimulation sont nécessaires. Ces protéines co-stimulatrices sont exprimées principalement sur les membranes des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et sont induites au cours de leur maturation. La voie de costimulation la plus connue est la voie B7/CD28. CD28 est exprimé par les lymphocytes T, B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) sont exprimés par les DC matures. Ce second signal permet le recrutement de kinases complémentaires comme la phosphoinositide-3 kinase (PI3K), ainsi que le soutien de la phosphorylation initiée par le TCR. Un troisième signal reposant sur la présence de cytokines dans l'environnement des lymphocytes permet leur éducation et l'acquisition définitive des fonctions effectrices. Particulièrement, la différenciation Th1 qui favorise une réponse cytotoxique cellulaire (CTL) est nécessaire à la genèse d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Cette réponse de type 1 est caractérisée par la production de cytokines, interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

Les réponses immunitaires doivent être finement régulées pour ne pas engendrer d'auto-immunité. Ainsi, des molécules comme CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*) sont synthétisées lors de l'activation initiale des lymphocytes T et agissent comme répresseurs de l'activation T. Les polymorphismes génétiques de CTLA-4 produisent des protéines d'une activité biologique variable. Les personnes exprimant certaines formes de CTLA-4 sont sujettes au développement de maladies auto-immunes telles que la maladie de Graves, la maladie coeliaque, l'hypothyroïdie auto-immune, le diabète de type I ou la sclérose en plaque (1).

Dans cette revue, nous indiquerons l'intérêt que peut apporter la modulation des signaux de costimulation en immunothérapie. Dans un premier temps, nous décrirons le développement de stratégies basées sur les ligands agonistes

des récepteurs de la famille TOLL favorisant l'induction de réponse immunitaire. Puis dans un second temps, nous étudierons la neutralisation des rétrocontrôles négatifs des signaux de costimulation aboutissant également à des réponses immunitaires efficaces. Dans ce contexte, nous nous consacrerons plus particulièrement à la protéine CTLA-4.

## Utilisation de ligands agonistes des récepteurs *Toll-like receptors* (TLR) en oncologie

### Historique des récepteurs de la famille *Toll-like receptors* (TLR)

Les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptors*, TLR) sont des homologues de la protéine Toll, une protéine impliquée dans le développement embryonnaire chez la drosophile et notamment l'établissement de la polarité dorsoventrale. En 1997, Ruslan Medzhitov, dans le laboratoire de Charles Janeway Jr, identifie TLR4, le premier gène homologue de Toll découvert chez les mammifères. Ce TLR se révélera, un an plus tard, être le récepteur du composant majoritaire de la paroi des bactéries à Gram négatif, le lipopolysaccharide ou LPS (2). Aujourd'hui, ces récepteurs TLR comptent 11 membres chez l'Homme, mais les ligands de TLR10 et TLR11 restent inconnus à ce jour. Ces récepteurs possèdent un domaine intracellulaire conservé homologue au domaine du récepteur pour l'interleukine-1 (IL-1R). Ils sont impliqués dans la reconnaissance des motifs moléculaires des agents pathogènes conservés au cours de l'évolution et regroupés sous le terme anglo-saxon de *pathogen associated molecular pattern* (PAMP). À ce titre, les TLR font partie de la famille des PRR (*pathogen recognition receptors*), tout comme le récepteur au mannose ou encore NOD. Ces PRR sont localisés principalement à la surface des cellules de l'immunité naturelle : monocytes/macrophages, cellules dendritiques, cellules NK et polynucléaires neutrophiles. Comme nous le décrirons ci-après, certains TLR sont aussi exprimés par les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes B, lymphocytes T), ainsi que les cellules épithéliales et endothéliales. La fonction générale de ces PRR et donc des TLR est de percevoir les signaux « Danger ». Cette notion de « Danger » a été énoncée pour la première fois en 1994 par Polly Matzinger (3). Cette théorie du « Danger » indique que la capacité de réponse du système immunitaire est directement reliée à la perception du « Danger ». Schématiquement, en l'absence de « Danger », le système immunitaire ne sera pas activé et il en résultera un phénomène de tolérance. À l'inverse, en cas de « Danger », une activation efficace du système immunitaire s'initiera (3). Quels sont les signaux « Danger » (4) et comment les TLR interviennent-ils dans la perception de ces signaux ? Il est possible de distinguer deux types de signaux « Danger » : les signaux exogènes émis par les agents pathogènes (c'est-à-dire les PAMP) et les signaux endogènes émis par l'organisme hôte suite à des dommages ou

des agressions tissulaires ou encore lors de dérèglements métaboliques. Afin de mieux clarifier cette notion de signaux « Danger » endogènes, nous citerons quelques exemples. Ainsi, rentrent dans cette catégorie les protéines du choc thermique ou HSP (pour *Heat Shock Protein*). Ces protéines chaperons intracellulaires, retrouvées en concentration élevée dans les cellules, voient leur expression augmentée lors du stress cellulaire. Certaines équipes ont proposé de les utiliser comme adjuvant en immunothérapie anti-tumorale (pour revue, 5). Des composés strictement ou majoritairement intracellulaires, comme l'acide urique (6) ou les nucléotides intracellulaires (UTP et ATP) associés au métabolisme énergétique (4) deviennent des signaux « Danger » endogènes lors de la rupture accidentelle de la membrane plasmique d'une cellule. Cette observation de la rupture de la membrane plasmique est bien connue des anatomopathologistes lors de la nécrose. L'interaction des TLR avec leurs ligands déclenche l'activation de différents mécanismes concourant à la réaction inflammatoire (induction de gènes de cytokines inflammatoires et de chimiokines, assurant le recrutement des polynucléaires neutrophiles et des macrophages) (7, 8) et à l'activation de la réponse immunitaire adaptative (induction des molécules HLA de classe II et de costimulation) (8). L'objectif de cette revue est de définir les rôles potentiels des TLR dans les réponses immunitaires anti-tumorales. Au préalable, nous aborderons la localisation cellulaire des TLR, leurs expressions et les principales voies de signalisation de ces récepteurs. Ceci permettra de mieux appréhender comment ces récepteurs PRR peuvent amplifier ou restaurer les réponses immunitaires anti-tumorales. Nous indiquerons également comment ces TLR peuvent aussi participer à la progression, l'invasion tumorale, la dissémination de métastases ou encore l'échappement au contrôle du système immunitaire (7, 9).

## Localisation, expression, et principales voies de signalisation des TLR

Les TLR peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur localisation cellulaire. Les TLR extracellulaires localisés à la membrane plasmique (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10) auront pour principale fonction de percevoir les signaux « Danger » provenant de l'extérieur, à savoir les PAMP exprimés à la surface des agents pathogènes (LPS, lipopeptides, acide lipoteichoïque, peptidoglycane des bactéries gram positif...) (tableau I). Sur la base de la séquence aminoacide et la structure génomique, les TLR1, TLR2, TLR6 et TLR10 appartiennent à la sous-famille TLR2 (10, 11). Ces TLR agissent sous forme d'hétérodimère TLR1/TLR2, TLR6/TLR2 et TLR10/TLR2. Les TLR intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), localisés au niveau des compartiments endosomaux ou lysosomaux, détectent les PAMP intracellulaires et notamment les acides nucléiques (ARN viraux simple ou double brin) et les dinucléotides CpG (séquence de cytosine-guanosine associée à des nucléotides flanquant)

**Tableau I** – Les principaux ligands de récepteurs TLR.

TLR	Principaux ligands exogènes (PAMP)	Ligands endogènes	Ligands ayant une activité thérapeutique en cancérologie
TLR1 + TLR2	Triacyl lipopeptides, lipoarabinomannane (mycobactéries)		
TLR2	Peptidoglycanes (bactéries à Gram +), zymosan (fungus), protéines virales (Herpes simplex-1, HCV, CMV, rougeole,...), phospholipides tréponémal, trypanosomes, glycosylphosphatidylinositol de protozoaires	Défensines, HSP60, HSP70, Radicaux oxygénés, HMGB1	BCG
TLR3	ARN double brin (virus, helminthes)	ARN messenger	Poly(I :C), Poly(A :U)
TLR4	LPS (bactéries à gram -), protéines virales (protéine F du RSV), lipides <i>Trypanosoma cruzi</i> ,	HSP70, HSP90, héparine, fragments polysaccharidiques du hyaluronane (hyaluronane soluble), fibrinogène, défensine bêta, HMGB1	CFA, BCG, taxols (paclitaxel), MPL
TLR5	Flagelline		
TLR6 +TLR2	Diacyl lipopeptides (mycoplasmes)		Imiquimod, Resiquimod
TLR7/ TLR8	ARN simple brin (Influenza, VSV, VIH, VRS)		
TLR9	Motifs CpG non méthylés (ADN viraux ou bactériens), schizontes de malaria	Chromatine de l'hôte	CpG ODN*

TLR2 agit sous forme d'hétérodimères avec TLR1 ou TLR6. TLR10 pourrait s'associer sous forme d'hétérodimères avec TLR1 et TLR2. Les ligands de TLR10 et TLR11 restent actuellement inconnus.

\* On compte différentes classes de d'oligodéoxynucléotides synthétiques CpG (CpD ODN) d'activité biologique différente : les CpG ODN classe A stimulent surtout la production d'IFN- $\alpha$  par les PDC, les classes B activent la maturation des PDC et la prolifération des lymphocytes B (ce sont les plus utilisés en thérapie antitumorale), les classes C possèdent les propriétés des classes A et B (20).

*Abréviations.* CMV : cytomégalovirus ; HCV : hépatite virale C ; CFA : adjuvant complet de Freund ; BCG : bacille de Calmette et Guérin ; CpG ODN : oligodéoxynucléotide synthétique CpG ; HMGB1, *High mobility group box 1* ; MPL : LPS synthétique ; VIH : virus de l'immunodéficience humaine ; VSV : virus des de la stomatite vésiculaire ; Poly(A:U) ; acide polyadénylique polyuridylique ; Poly(I :C) : acide polyinosylique polycytidylique ; VSR ; virus respiratoire syncytial.

non méthylés (10, 11). En effet, les mammifères diffèrent des procaryotes dans le degré de méthylation des dinucléotides CpG, les procaryotes présentant beaucoup de motifs CpG non méthylés. La reconnaissance spécifique de ces dinucléotides CpG non méthylés et non des dinucléotides CpG méthylés par TLR9 permet d'établir la distinction entre de l'ADN du soi et des acides nucléiques viraux. Cette compartimentation cellulaire (membrane plasmique/endosomes) des TLR n'est pas absolue. TLR8 aurait une localisation intracellulaire majoritaire, mais pourrait aussi être exprimé sur la membrane plasmique (10). TLR3 verrait sa localisation cellulaire changer selon la cellule auquel il appartient. Les cellules dendritiques l'exprimeraient seulement au niveau intracellulaire, alors qu'une expression extra-cellulaire est aussi retrouvée pour les fibroblastes et les cellules épithéliales (11). TLR4 pourrait percevoir le LPS au niveau intracellulaire dans les cellules épithéliales intestinales (11).

Du point de vue de l'expression cellulaire, les TLR sont exprimés sur les cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, mastocytes, cellules NK) (tableau II), les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes B, lymphocytes T CD4 comme CD8 et même régulateurs) (12) (tableau II), et les cellules « non immunes » comme les fibroblastes (11), les cellules endothéliales (13) et certaines cellules épithéliales (bronchiques, gastro-intestinales, urogénitales) (13, 14). De ce fait, les TLR pourront être aussi exprimés par les cellules provenant de ces tissus et soumis à un processus de transformation (7). Le profil d'expression des TLR répond ainsi à une distribution spécifique en fonction des tissus et des types cellulaires. Ceci permet de réguler plus finement la réponse immunitaire. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont la principale source d'interféron-alpha (IFN- $\alpha$ ) de l'organisme et jouent un rôle primordial dans la réponse immune antivirale. Elles expriment majoritairement les TLR7 et TLR9 afin de percevoir l'ADN viral simple brin et les motifs CpG non méthylés (15). À l'inverse, les cellules dendritiques myéloïdes immatures présentent un profil d'expression complémentaire avec l'expression des TLR membranaires TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 et les TLR endosomaux TLR3 et TLR7 (15). La stimulation de ces TLR par leurs ligands aboutira à la synthèse et la sécrétion d'interleukine-12 (IL-12) permettant, tout comme la synthèse d'IFN- $\alpha$  par les PDC, l'initiation d'une réponse de type I (8) (tableau II).

Nous avons déjà abordé succinctement au cours de cette revue les conséquences de l'engagement d'un TLR par son ligand respectif. Ces conséquences dépendent évidemment de la cellule exprimant le TLR. Ainsi, les cellules douées de propriétés phagocytaires, comme les macrophages, les polynucléaires ou les cellules dendritiques immatures, voient leur capacité de phagocytose stimulée par l'interaction TLR/ligand (8, 15) (tableau II). Les cellules dendritiques produisent de l'IL-12 ou de l'IFN- $\alpha$  pour mettre en place une immunité à médiation cellulaire efficace aboutissant à l'élimination de l'agent pathogène (8). Citons un dernier exemple, qui pourra avoir des conséquences pour l'immunothérapie anti-tumorale, la possibilité que les ligands des TLR (TLR8 ou TLR2, notamment) puissent s'opposer à la suppression de la réponse immunitaire causée par

**Tableau II** – Les principales fonctions associées à la stimulation des cellules immunitaires humaines par des ligands de récepteurs TLR.

Principales cellules immunitaires	Fonctions	Principaux TLR impliqués dans la fonction
Cellules dendritiques conventionnelles*	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Production d'IL-12 (oriente vers réponse de type I)</li> <li>– Migration vers le ganglion de drainage (É CCR7)</li> <li>– ↑ Expression des molécules de HLA classe II et de costimulation</li> <li>– ↑ l'internalisation de l'antigène</li> <li>– favorise la présentation croisée aux LT CD8+</li> </ul>	TLR1/2/6, TLR5, TLR8 TLR1/2/6, TLR5, TLR8 TLR1/2/6, TLR5, TLR8 TLR2, TLR7/8 TLR3
Cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Production d'IFN-<math>\alpha</math> (oriente vers réponse de type I)</li> <li>– favorise la présentation croisée aux LT CD8+</li> <li>– résistance à l'apoptose</li> <li>– Migration vers le ganglion de drainage (É CCR7)</li> </ul>	TLR7, TLR9 TLR9 TLR9 TLR7, TLR9
Monocytes/macrophages	<ul style="list-style-type: none"> <li>– phagocytose</li> <li>– Production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1b, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>)</li> <li>– Production de chémokines (CCL2, CCL3, CCL4, IL-8/CXCL8, CXCL2/3)</li> </ul>	TLR9 TLR1/2/6, TLR5, TLR8 TLR1/2/6, TLR5, TLR8
Cellules NK	<ul style="list-style-type: none"> <li>– production de défensine alpha</li> <li>– ↑ cytotoxicité</li> <li>– Production d'IFN-<math>\gamma</math></li> <li>– Production de TNF-<math>\alpha</math></li> </ul>	TLR2, TLR5 TLR3, TLR2 TLR2, TLR3, TLR5, TLR9 TLR3, TLR9
Lymphocytes B	<ul style="list-style-type: none"> <li>– stimulation des réponses B</li> <li>– commutation isotypique</li> <li>– ↑ Expression des molécules de costimulation</li> <li>– résistance à l'apoptose</li> <li>– Migration vers le ganglion de drainage (É CCR7)</li> <li>– Différentiation en plasmocytes (avec BCR pour LB naïve sans BCR pour les LB mémoires)</li> </ul>	TLR9, TLR2 TLR9, TLR2 (avec BCR et coopération avec le LT CD4) TLR9 TLR9 TLR9 TLR9, TLR2
Lymphocytes T CD4	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Polarisation TH1 (effet via CPA)</li> <li>– Polarisation TH2 (effet via CPA)</li> <li>– ↑ de la production de cytokines (IL-2, IL-8, IL-10, TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math>) par LT CD4 mémoires</li> <li>– ↑ prolifération des LT CD4 mémoires</li> <li>– ↑ production d'IL-8</li> <li>– ↓ production d'IL-8</li> <li>– ↑ de la survie</li> </ul>	TLR4 TLR2, TLR5 TLR2, TLR5, TLR7/8 (avec TCR) TLR2, TLR5, TLR7/8 (avec TCR) TLR2, TLR5 (avec TCR) TLR7 (avec TCR) TLR3 (avec TCR)
Lymphocytes T CD8	<ul style="list-style-type: none"> <li>– ↑ production d'IFN-<math>\gamma</math> par les LT CD8 effecteurs</li> </ul>	TLR3 (avec TCR)
Lymphocytes T régulateurs	<ul style="list-style-type: none"> <li>– inhibition des fonctions suppressives (LT murins)</li> </ul>	TLR8, TLR2 (avec TCR)

\* cellules dendritiques conventionnelles appelées autrefois cellules dendritiques myéloïdes.

TLR2 agit sous forme d'hétérodimère avec TLR1 ou TLR6. TLR1 est ubiquitaire.

D'après les références 8, 11-13, 15 et 20.

les lymphocytes T régulateurs (12). Ces fonctions sont délivrées par un nombre limité de voies de signalisation, conservées par les différents TLR. Il est généralement accepté que tous les TLR (en particulier TLR2, TLR5, TLR7, TLR8 et TLR9) à l'exception de TLR3 utilisent la molécule MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response protein 88*), comme protéine adaptatrice pour initier la voie de signalisation puis des kinases de la famille IRAK (*IL-1 Receptor-Associated Kinase*) (10, 16). TLR3 implique les protéines adaptatrices, Trif (*TIR domain containing adaptator-inducing IFN- $\beta$* ) et *IFN-related factor 3* (16). TLR4 utilise à la fois des voies de signalisation dépendantes de MyD88 et indépendantes de MyD88 dont celle de Trif par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice TRAM (*Trif-related adaptator molecule*) (10, 16). Ces voies de signalisation aboutissent à l'activation et la translocation vers le noyau des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 (*activating-protein-1*) (16). Il en découle ensuite la transcription de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$ .

Les TLR peuvent aussi signaler *via* les caspases les protéases impliquées dans l'induction de l'apoptose. Par exemple, l'activation de TLR peut aboutir à la sécrétion d'IL-18 de manière indépendante de MyD88. Dans ce contexte, les TLR induisent la caspase 1 qui permet la conversion de la pro-IL-18 en IL-18. Ce processus favorise la polarisation Th1 des réponses immunitaires (17).

## Bases fondamentales de l'implication des TLR en cancérologie et modèles expérimentaux

Les premiers balbutiements de l'immunothérapie ont, sans le savoir, utilisé des ligands des TLR. Ainsi l'adjuvant complet de Freund – bien connu des immunologistes pour faciliter une réponse anti-tumorale cellulaire et humorale – qui correspond à la mycobactérie *Mycobacterium bovis* inactivée par la chaleur mise en suspension dans de l'huile minérale, active la réponse immunitaire *via* les TLR et plus particulièrement TLR4 (8, 18) (tableau I). L'effet adjuvant obtenu dans les cancers superficiels de la vessie avec le BCG résulte aussi d'une activation des TLR2 et TLR4 (18, 19) (tableau I). L'utilisation de ligands agonistes peut se fonder sur deux mécanismes d'action différents. D'une part, les ligands de TLR peuvent interagir avec les cellules immunitaires pour favoriser l'activation du système immunitaire inné, augmenter les signaux de costimulation nécessaires aux lymphocytes T et amplifier ainsi l'efficacité des réponses immunes. D'autre part, ces ligands pourraient également directement agir sur les cellules tumorales qui expriment des TLR.

### *Les ligands de TLR comme agents immunomodulateurs*

Les différentes propriétés, mentionnées ci-dessus, confèrent aux TLR des fonctions adjuvantes particulièrement intéressantes pour améliorer l'efficacité des stratégies d'immunothérapies. Plus particulièrement, la capacité des ligands

de TLR à promouvoir la maturation des DC et l'activation des cellules NK est favorable à l'obtention d'une réponse vaccinale Th1 de bonne qualité. De plus, certains travaux suggèrent que des ligands de TLR (TLR2 et TLR8) pourraient abolir les fonctions suppressives de lymphocytes T tolérogènes (12).

Les ligands de TLR après administration exercent effectivement des activités anti-tumorales dans différents modèles de cancer murin (8, 20). Les ligands de TLR administrés seuls peuvent favoriser un rejet tumoral, lorsque les tumeurs sont de petite taille. Cet effet implique la réponse adaptative et les lymphocytes T. Les oligodéoxynucléotides synthétiques CpG (CpG ODN) activent en premier lieu les lymphocytes B et les PDC. Les PDC migrent de la zone marginale vers les zones T des ganglions lymphatiques, sécrètent de l'IFN- $\alpha$ , expriment les molécules de costimulation et activent les lymphocytes T. La cytotoxicité des cellules NK est aussi augmentée par l'intermédiaire de la production d'interférons. Lorsque les tumeurs sont plus volumineuses, une approche combinant anticorps monoclonaux, radiothérapie, chirurgie et/ou chimiothérapie anticancéreuse est nécessaire pour éradiquer la tumeur (20). L'effet adjuvant des ligands synthétiques de TLR9 est capable d'augmenter l'immunogénicité d'approches d'immunothérapie utilisant aussi bien des peptides tumoraux, de l'ADN tumoral, des cellules tumorales ou des cellules dendritiques pulsées avec des antigènes tumoraux (8). Les résultats obtenus dans ces modèles expérimentaux permettent d'envisager de manière encourageante un transfert vers la clinique.

### ***Les ligands de TLR utilisés comme agent thérapeutique ciblant directement les cellules tumorales***

Les cellules tumorales elles-mêmes pourraient exprimer les TLR. Ceci est observé pour les cellules tumorales issues des leucocytes (leucémies ou lymphomes). Les carcinomes épidermoïdes peuvent également exprimer des TLR (13). À notre connaissance, une cartographie détaillée de l'expression de TLR par type de cancer n'est pas disponible du fait de la difficulté d'analyse de l'expression de ces récepteurs en immunohistochimie. En revanche, différentes études rapportent l'expression de TLR par des lignées cellulaires tumorales établies issues des tumeurs suivantes : pulmonaire, mammaire, colique, prostatique (9), uroépithéliales (21), carcinomes gastriques (14), ovariens (22), choriocarcinomes (23), neuroblastomes (24), mélanomes (25). Les principaux TLR exprimés par ces tumeurs seraient TLR2, TLR4, TLR9, mais aussi le TLR1, TLR3, TLR5 et TLR6 (9, 14, 21-25). Ceci confère aux cellules tumorales la capacité de répondre aux ligands de TLR utilisés en thérapeutique (tableau III). La transformation néoplasique pourrait aussi conduire à la perte de l'expression de TLR, comme le suggère une étude sur l'expression de TLR3 par les hépatocytes et les hépatocarcinomes (26). La présence de TLR3 serait nécessaire pour l'activation de la cytolysse hépatique par les lymphocytes T cytotoxiques après infection virale (27). Ainsi, la perte d'expression de TLR3 par les hépatocarcinomes pourrait

expliquer leur échappement à la cytotoxicité cellulaire des cellules NK ou des lymphocytes T cytotoxiques. Cela nous amène à considérer les effets potentiels de la stimulation des TLR exprimés par les tumeurs. L'interaction ligand/TLR exprimés par les cellules tumorales peut aboutir à différentes conséquences. La stimulation de TLR3 par son ligand l'acide polyinosinique polycytidylique (Poly(I:C)) aboutit à l'apoptose de cellules du cancer du sein (28). Après engagement du TLR3 par le poly(I:C), les cellules de cancer du sein rentrent en apoptose. Cette apoptose implique l'activation de la caspase-3 et de la caspase 8 (28). Dans ce cas, les TLR utilisent approximativement la même signalisation que les récepteurs de mort comme Fas et notamment le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (29). Cette induction d'apoptose pourra être mis à profit pour lutter contre les tumeurs.

Néanmoins, il existe également des données indiquant que les TLR peuvent être impliqués dans des mécanismes favorables à l'échappement du système immunitaire et à la progression des cancers.

Les effets qui résultent de l'interaction d'un TLR avec son ligand sont dépendants de la dose du ligand et de la cinétique de stimulation (effet dose et temps dépendant). De même, la stimulation répétée d'un TLR peut induire un signal négatif par un système de mécanisme *feed back*, impliquant une signalisation *via* les molécules SOCS (*Suppression Of Cytokine Signalling*) par exemple (13, 20). Les signaux TLR peuvent être inhibés à différents niveaux : par la présence de TLR solubles (sTLR2 et sTLR4), des inhibiteurs intracellulaires (A20, SOCS1...) (29). L'interaction de TLR4 avec ses ligands induit la synthèse de monoxyde d'azote (NO) (7) potentiellement néfaste pour les cellules immunitaires. Il a été aussi rapporté la stimulation de la synthèse de protéases (métalloprotéinases) participant à la dégradation la matrice extra-cellulaire, de molécules d'adhérence (intégrines) qui pourraient favoriser des phénomènes d'invasion et de propagation tumorale (7). L'induction de molécules inhibant l'activation lymphocytaire comme B7H à la surface de cellules tumorales par des ligands de TLR4 a été décrite (9). Les ligands de TLR peuvent aussi induire la synthèse de cytokines immunomodulatrices comme l'IL-10 (7). Ces données doivent être prises en considération lors de la conception de stratégies thérapeutiques utilisant des ligands des TLR.

### Utilisations thérapeutiques potentielles (tableau III)

La preuve du concept de l'efficacité anti-tumorale des ligands de TLR repose sur les résultats encourageants et spectaculaires obtenus lors de protocoles évaluant l'utilisation de crèmes à base d'imiquimod (Aldara<sup>TM</sup>), un ligand synthétique de TLR7 (tableau I), lors du traitement de carcinomes basocellulaires présentant une localisation superficielle (30, 31) (tableau III). Des études contrôlées randomisées ont montré la régression histologique dans 78 à 87 % de ces carcinomes superficiels après application locale cinq jours par semaine pendant six semaines (31). L'effet bénéfique de l'imiquimod résulterait d'une stimulation

**Tableau III** – Principaux essais cliniques menés en cancérologie utilisant des ligands de TLR.

Ligand TLR utilisé	TLR incriminé(s)	Cancer	Résultats	Mécanisme(s) suspecté(s)
BCG	TLR2, TLR4	Carcinome colorectal avancé	É ↑ la réponse IgM dirigé contre l'antigène de tumeur co-administré (TA90), corrélation avec survie	Effet adjuvant (Habal), administration avec un antigène tumoral
BCG	TLR2, TLR4	Cancer du côlon	44 % de réduction des rechutes après 5 ans de suivi	Effet adjuvant (Vermorken), administration avec cellules tumorales irradiées
BCG	TLR2, TLR4	Cancer superficiel de la vessie	Réponses cliniques observées	(19), administration sans antigène
CpG ODNs	TLR9	Mélanome	É ↑ la réponse CTL	Effet adjuvant (32), administration avec peptide MelanA
CpG ODNs	TLR9	Lymphomes non hodgkiniens	– É NK ↑ cytotoxicité NK	Effet adjuvant (20) monothérapie sans antigène
CpG ODNs	TLR9	Mélanome	É la réponse spécifique anti-tumorale	Effet adjuvant (20), administration avec peptide MAGE-3
CpG ODNs	TLR9	Lymphomes non hodgkininens	Marqueurs biologiques induit par CpG ODN, pas de toxicité	Combinaison avec Rituximab (33)
CpG ODNs	TLR9	Mélanome	2 réponses partielles et 3 stabilisations sur 20 patients traités	Effet adjuvant (34)
CpG ODNs	TLR9	Tumeurs solides réfractaires		Combinaison avec taxane/platinum (20)
Imiquimod	TLR7 (TLR8 ?)	Mélanome	É la réponse spécifique anti-tumorale (peptides NY-ESO-1), pas d'effet clinique	Effet local, association avec peptide de mélanome et le ligand de FLT3 (Shackleton)
Imiquimod	TLR7 (TLR8 ?)	Carcinome basocellulaire	Réponses cliniques observées	(30, 31), administration local sans antigène
MPL	TLR4	Mélanome, glioblastome, carcinome colorectal, carcinome pancréatique	É la réponse spécifique anti-tumorale, pas d'effet clinique	Effet adjuvant (pour revue Baldrige) administration avec antigène tumoral

Ligand TLR utilisé	TLR incriminé(s)	Cancer	Résultats	Mécanisme(s) suspecté(s)
Poly(A:U)	TLR3	Cancer du sein	É ∅ la survie par rapport au groupe placebo	Analyse <i>a posteriori</i> de patientes traitées*
Poly(A:U)	TLR3	Cancer du sein	É ∅ la survie et É de l'incidence des métastases par rapport au groupe sans Poly(A:U)	Avec radiothérapie locorégionale (Laplanche)

\*André F, Massard C, Assi H *et al.*, (2006) Toll like receptor 3 expression and efficacy of adjuvant treatment with polyadenylic-polyuridylic acid in patients with axillary node positive breast cancer: Results from two randomized trials. ASCO Annual Meeting Proceedings. Journal of Clinical Oncology, (June 20 Supplement), Vol 24, No 18S : 10563.

des pDC, qui à leur tour libéreraient de l'IFN- $\alpha$  puis activeraient les effecteurs du système immunitaire (30). Autres tumeurs superficielles, les cancers de la vessie peuvent aussi répondre à l'administration de BCG (19). En revanche, pour les tumeurs plus avancées, les réponses cliniques sont moins évidentes.

Plusieurs études cliniques rapportent l'utilisation de ligands de TLR pour exercer un effet anti-tumoral (tableau III). Il est possible de distinguer l'utilisation comme agent adjuvant avec co-administration d'un antigène au sens large (du peptide tumoral aux cellules tumorales inactivées) ou seul sans administration d'antigène.

### **Les ligands de TLR administrés en plus d'une autre approche d'immunothérapie**

L'association de ligands de TLR et d'approches d'immunothérapie peut être toutefois un débouché intéressant pour ces molécules (comme CpG ODN). Nous avons choisi de l'illustrer par deux exemples. Le CpG ODN augmente la réponse T CD8 cytotoxique contre l'antigène de tumeur MelanA (32) et pourrait augmenter la cytotoxicité NK, la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) lors de l'administration combinée avec un anticorps monoclonal à effet anti-tumoral (20). Le *monitoring* d'une telle étude a permis d'identifier des gènes induits par les IFN de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) chez les patients recevant des CpG ODN avec l'anticorps rituximab (33).

### **Les ligands de TLR administrés seuls**

Des études cliniques ont aussi choisi d'administrer le ligand de TLR seul. Ainsi, Pashenkov *et al.* rapportent une étude de phase II évaluant l'intérêt d'un CpG ODN dans le traitement des mélanomes. Vingt patients porteurs de mélanome

de stade IIIc ou IV furent inclus et traités par des injections sous-cutanées hebdomadaires. Deux réponses partielles et trois stabilisations de la maladie ont été observées, ce qui confirme l'activité biologique de ces molécules (34). Antoine Carpentier *et al.* ont réalisé une étude de phase I évaluant la faisabilité de l'administration de CpG ODN directement dans des glioblastomes, chez 24 patients réfractaires aux traitements conventionnels. L'administration de CpG ODN s'est avérée non toxique. Les auteurs rapportent une diminution de taille (< 50 %) pour deux patients et une survie globale médiane de 7,2 mois (35).

Les cibles des ligands de TLR peuvent être les cellules de l'immunité adaptative (cellules dendritiques, cellules NK), mais aussi les cellules tumorales elles-mêmes (28, 36). Certains agents anticancéreux comme les taxols pourraient induire l'apoptose des cellules tumorales après interaction avec les TLR, TLR4 en l'occurrence pour les taxols (36). Cependant, la signalisation induite par les TLR est complexe. TLR4 possède une voie impliquant MyD88 et une autre indépendante de MyD88. Il se pourrait que la voie MyD88 puisse induire la résistance des cellules du cancer de l'ovaire au paclitaxel (22). L'importance de la signalisation TLR dans la réponse au traitement est soutenue par l'association entre certains polymorphismes de TLR4 ou d'associations de polymorphismes de TLR1, TLR6 et TLR10 et la survenue de cancers de la prostate (7). Si l'on se place dans le cadre de l'immunosurveillance des cancers, ces polymorphismes de TLR qui généreraient des récepteurs moins fonctionnels à la surface des tumeurs empêcheraient leur éradication par le système immunitaire. Une meilleure efficacité de l'utilisation des ligands de TLR (synthétique ou médicament anticancéreux) passe par une connaissance plus approfondie des voies de signalisation des TLR. Fabrice André *et al.* ont analysé l'expression de TLR3 dans une cohorte de 182 patientes incluses dans un essai thérapeutique évaluant l'intérêt de l'injection intraveineuse d'un ligand de TLR3 (polyA-U) après chirurgie d'un cancer du sein localisé et présentant un envahissement ganglionnaire. L'expression de TLR3 était observée sur 18 tumeurs mammaires (9,9%). L'administration du ligand de TLR3 était associée à une amélioration de la survie globale chez les patientes dont les cancers expriment TLR3. Les auteurs ne rapportent pas de bénéfice clinique dans le groupe de patientes dont les tumeurs n'expriment pas TLR3 (F. Andre *et al.* Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2004, abstr 9619).

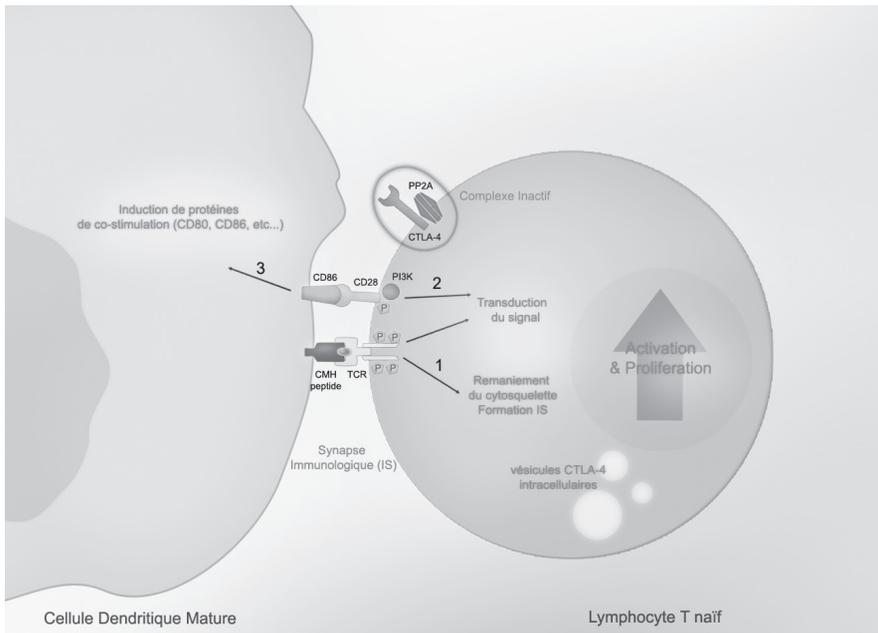
En conclusion, la stimulation *via* les TLR semble une voie d'avenir dans le traitement des cancers. Mis à part l'exception de l'imiquimod, de nouvelles recherches sont nécessaires pour accroître l'efficacité de tels traitements. En revanche, aucune toxicité significative (mis à part des syndromes grippaux) n'a été rapportée malgré le risque d'auto-immunité lié à la stimulation des TLR (34). Des outils ont été mis en place pour suivre la réponse (profil de gènes induits, évaluation des réponses anti-tumorales). Ces progrès réalisés dans le domaine du *monitoring* des patients pourront servir, au même titre que la compréhension de l'expression des TLR et leur signalisation, à développer et rendre efficace l'utilisation des ligands de TLR.

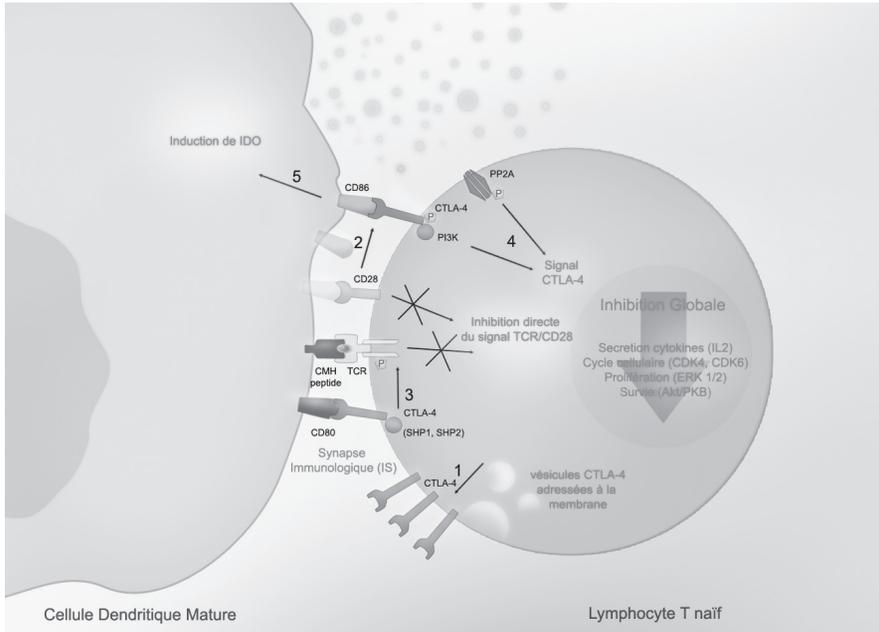
L'activation des TLR est une stratégie ciblant les signaux de costimulation. La neutralisation de CTLA-4 a principalement pour objectif de bloquer un rétrocontrôle négatif des réponses immunitaires. De nombreux travaux confirment l'intérêt de cette approche.

## Utilisation d'anticorps neutralisant CTLA-4 en oncologie

### Biologie de CTLA-4

Les récepteurs de la famille des récepteurs de costimulation comprenant le CD28 comportent un domaine extra-cellulaire immunoglobulinique et une portion intracytoplasmique courte. Les molécules CD28 et ICOS (*Inducible COStimulator*) furent caractérisées secondairement à des travaux concernant des anticorps ciblant ces protéines et induisant la prolifération des lymphocytes T. CD28 est exprimé constitutivement sur la plupart des lymphocytes T CD4 et sur 50% des lymphocytes T CD8. Il est précocement induit lors de l'activation du lymphocyte, atteignant un pic d'expression à 24 heures. L'implication de CD28 dans la genèse des réponses immunitaires efficaces fut suggérée par la perte de l'expression de cette molécule lors des infections chroniques et du vieillissement. L'activation de lymphocytes T par des anticorps agonistes de CD28 engendre une augmentation de leurs fonctions métaboliques, une proli-





**Fig. 1** – Mécanismes d’action de CTLA-4 lors d’une interaction entre un lymphocyte T naïf (LT) et une cellule dendritique mature (CDm).

(A) L’interaction LT naïfs CDm a lieu au sein des organes lymphoïdes secondaires. L’activation du LT nécessite un premier signal (1) spécifique induit par la fixation du TCR au complexe CMH : peptide présenté par la CDm. Un second signal (2) apporté par l’interaction CD28/CD86 permet d’amplifier le signal délivré par le TCR et de soutenir la phosphorylation des protéines impliquées dans l’activation du LT. L’activation du lymphocyte T amplifie également l’expression des molécules de costimulation (CD80, CD86) par les CDm (3). À noter que le signal du TCR induit un remaniement du cytosquelette d’actine et des microtubules, aboutissant à la formation d’une synapse immunologique (IS) structurant l’interaction entre les deux cellules. Des vésicules contenant des protéines CTLA-4 sont présentes au niveau intracellulaire. Les protéines de CTLA-4 membranaires sont associées à PP2A, une sérine/thréonine phosphatase. Cette association inactive les deux protéines.

(B) Au cours de l’activation du LT, la phosphorylation de CTLA-4 entraîne son activation. Les voies d’action de CTLA-4 sont multiples et semblent inhiber l’activation du LT à de nombreux niveaux. (1) Les vésicules de CTLA-4 intracellulaires peuvent migrer dans la zone d’interaction cellulaire et augmentent rapidement l’expression membranaire de CTLA-4 (2). La plus forte avidité/affinité de CTLA-4 pour les ligands du CD28 favorise une compétition à la fixation de CD80/CD86. Ceci aboutit à la répression du signal transduit par CD28. (3) Grâce à sa partie intra-cytoplasmique, CTLA-4 recrute des phosphatases (SHP1, SHP2) qui pourraient directement interférer avec le niveau de phosphorylation du TCR. (4) CTLA-4 possède un domaine de fixation à la kinase PI3K, qui séquestre PI3K. Il est possible que CTLA-4 induise une voie de signalisation propre nécessitant le recrutement de cette protéine. PP2A est phosphorylée par la cascade d’activation et se dissocie de CTLA-4, déclenchant son activité phosphatase. Elle réprime la voie Akt/PKB. (5) Le signal transmis par CTLA-4 est bidirectionnel et engendre une synthèse d’IDO par la CDm. Cette enzyme est sécrétée et catabolise le tryptophane, un acide aminé essentiel pour le LT. La conséquence directe est l’inhibition de prolifération du LT.

fération, une synthèse accrue d'IL-2, une résistance à l'apoptose et la production de nombreuses cytokines comme l'IFN- $\gamma$  (37).

CTLA-4 ou CD152 est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Elle est exprimée à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 sous la forme d'un homodimère de 43 kDa. Chez l'homme, le gène est localisé sur le chromosome 2 et il comporte 4 exons. L'épissage alternatif du transcript primaire peut produire une protéine transmembranaire (exons 1-4, CTLA-4) ou une forme soluble (exons 1, 2, 4, sCTLA-4). La protéine est principalement induite tardivement (48 h-72 h) au cours de l'activation du lymphocyte T. Son induction est proportionnelle à la force du signal du TCR (38). CTLA-4 et CD28 sont homologues à 30% au niveau protéique. Cette similitude est associée à la reconnaissance de ligands identiques, comme les molécules CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2). CTLA-4 peut se fixer à deux protéines de CD80/CD86 à la fois, cela lui confère une plus forte avidité. Il a été longtemps admis que l'affinité de CTLA-4 pour CD80 et CD86 était plus forte que celle du CD28. Cependant de récentes données décrivent une plus forte affinité entre CTLA-4 et CD80 d'une part et CD28 et CD86 d'autre part. De plus, les profils d'expression de ces deux ligands miment en partie ceux de CTLA-4 et CD28, ce qui permet de mieux comprendre le déroulement séquentiel de la signalisation CD28/CTLA-4. En effet, CD86 est exprimé de manière constitutive sur les CPA et il est induit rapidement pour atteindre un pic d'expression à 24 h. CD80 a une expression plus tardive, atteignant un pic 48 h à 72 h après activation de la CPA (39). CTLA-4 est aussi exprimée de manière constitutive sur certains lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T mémoires possèdent une plus grande réserve de CTLA-4 intracellulaire, rapidement adressée à la membrane secondairement à différents signaux d'activation. En effet, CTLA-4 est liée au cytosquelette par des molécules adaptatrices dépendant des clathrines, AP-1 et AP-2 (40). Lors de l'activation des lymphocytes T, CTLA-4 est recruté dans le site des interactions entre les CPA et les lymphocytes T et se co-localise avec le TCR (41).

L'inhibition des lymphocytes T par CTLA-4 semble reposer sur des mécanismes complémentaires (42). Premièrement, la forte avidité de CTLA-4 pour les récepteurs CD80 et CD86 suggère une compétition à la fixation du CD28 à ces mêmes ligands. CTLA-4 interagit avec CD86, ce qui séquestre les ligands potentiels du CD28. Quarante-huit à 72 heures après maturation des DC, CD80 est fortement induite, accentuant la séquestration et l'inhibition occasionnée. Pourtant ce mécanisme n'explique pas l'intégralité des fonctions de CTLA-4 observées *in vivo*. L'inhibition induite par CTLA-4 peut s'établir en l'absence de CD28, ce qui remet en question l'hypothèse de compétition à la fixation au ligand (43). En effet, des expériences utilisant des lymphocytes exprimant un CTLA-4 mutant ayant une portion intracytoplasmique tronquée ont démontré que l'absence de signalisation compromettrait la fonction de CTLA-4 *in vivo* (44). De plus, les autres fonctions de CTLA-4 sont liées à sa portion cytoplasmique qui contient de nombreux domaines de fixation pour des protéines de signalisation (PI3K, SHP1, SHP2 et PP2A) (45-47). Les données sont encore peu détaillées et

plusieurs modèles sont explorés. La fixation de CTLA-4 à son ligand pourrait induire le recrutement au niveau intracellulaire de phosphatases comme SHP1, SHP2 et PP2A. Son rôle serait de diminuer l'état de phosphorylation du TCR et des LAT (*Linker for Activation of T cells*) après interaction avec CTLA-4. Ainsi, des études rapportent une activité phosphatase de CTLA-4 (48), mais à ce jour les protéines impliquées ne sont pas connues. D'autres travaux mettent en avant un rôle de CTLA-4 en aval du signal du TCR. Ils suggèrent une diminution des protéines ERK-1/2 conduisant à une réduction de la production d'IL2 (49, 50). PP2A (*Protein Phosphatase 2A*), une sérine/thréonine phosphatase, est souvent évoquée dans les études de signalisation de CTLA-4. Cette protéine trimérique peut agir comme inhibiteur de la protéine kinase B et de Akt, deux composants majeurs de la signalisation du TCR (51, 52). Elle peut interagir, grâce à sa sous-unité PP2AA, avec CTLA-4. Sous cette conformation, les deux protéines sont inactives sur les lymphocytes T naïf (53). Après activation du signal du TCR, PP2A est phosphorylée et se détache de CTLA-4. Les deux protéines sont alors libres d'induire leurs signaux inhibiteurs. Enfin, CTLA-4 peut interagir directement avec la PI3K, une kinase importante dans l'activation des lymphocytes T qui est recrutée par le CD28 après engagement de CD80 ou CD86. Le recrutement de la PI3K par CTLA-4 peut se concevoir comme une compétition avec le recrutement de la PI3K par CD28 et signifier une séquestration de cette molécule pour compromettre la capacité de transmission du signal activateur. Cependant, il n'est pas exclu que PI3K ait une signalisation propre dépendante de CTLA-4, mais celle-ci n'est pas connue à ce jour. Il existe ainsi une forte corrélation entre les activités CTLA-4 et CD28 permettant une fine régulation de l'activité du lymphocyte T. Les différents mécanismes d'actions de CTLA-4 évoqués sont exposés dans la figure 1.

L'engagement de CTLA-4 a également un effet négatif sur l'organisation des synapses immunologiques. Les phosphatases recrutées par CTLA-4 pourraient prévenir l'activation des molécules adaptatrices favorisant la polymérisation du cytosquelette et la polarisation des radeaux lipidiques dans la zone d'interaction membranaire entre CPA et lymphocytes T CD4. Ainsi, CTLA-4 exercerait directement une fonction inhibitrice pour la constitution des synapses immunologiques (54, 55).

CTLA-4 a d'autres fonctions décrites dans la littérature. Elle régule négativement la sécrétion de cytokines (par inhibition de l'accumulation des facteurs de transcription AP-1, NFAT et NF- $\kappa$ B dans le noyau) (56, 57). CTLA-4 peut aussi réguler la prolifération cellulaire (la cycline D3, CDK4 et 6 peuvent être inhibées) (58). Il est aussi important de noter que l'engagement de CTLA-4 par les récepteurs CD80 et CD86 n'induit pas un signal unidirectionnel. En effet, CTLA-4 active la voie de catabolisme du tryptophane au sein de la DC présentant CD80-CD86. Ainsi, l'engagement de CTLA-4 favorise la production autocrine ou paracrine de l'enzymeIDO (Indole amine 2,3-DiOxygénase) par les CPA (59). Le substrat deIDO est le tryptophane, un acide aminé essentiel.IDO dégrade le tryptophane, ce qui inhibe la prolifération cellulaire et peut

promouvoir l'apoptose. Cette propriété de CTLA-4 est particulièrement intéressante pour des thérapies visant à induire une tolérance.

CTLA-4 est aussi exprimé constitutivement par les lymphocytes T régulateurs à des taux très importants. CTLA-4 est ainsi présent dans le cytoplasme des lymphocytes T régulateurs non activés et peut être adressé à la membrane au décours d'une stimulation, où lorsque ces lymphocytes régulateurs sont purifiés à partir des tumeurs (60). Des hypothèses sur le rôle de la protéine au sein de cette population ont été avancées. Notamment, les Treg CTLA-4+ pourraient interagir directement avec les DC présents dans les OLS et stimuler la synthèse d'IDO de manière paracrine, inhibant la réponse immunitaire (61).

## Fonctions de CTLA-4

Les différentes fonctions de CTLA-4 ont été étudiées dans un premier temps dans des modèles *in vitro*. Des expériences de stimulation par anticorps ciblant CTLA-4 ont montré une diminution de la prolifération et de la production d'IL-2 des lymphocytes T stimulés (62). Ces premières données suggéraient un rôle inhibiteur de CTLA-4. Par la suite, des modèles *in vivo* de souris déficientes en CTLA-4 ont permis de mieux comprendre le rôle de cette molécule dans le système immunitaire. Ces souris ont un phénotype normal à la naissance, leur thymus est de taille normale et aucune irrégularité n'est observée dans les populations lymphocytaires. Pourtant, 5-6 jours après leur naissance, une forte proportion de lymphocytes T activés envahit les tissus non lymphoïdes, induisant la mort de l'animal en trois à quatre semaines. Les pathologies observées sont multiples (63). De nombreuses destructions tissulaires comprenant des myocardites, pancréatites, lymphadénopathies et splénomégalies sont observées. De plus, les organes lymphoïdes des souris déficientes en CTLA-4 contiennent dix fois plus de lymphocytes T, traduisant ainsi une prolifération lymphocytaire excessive et incontrôlée des lymphocytes. Les lymphocytes T déficients en CTLA-4 ont un phénotype caractéristique d'un lymphocyte T activé, indépendamment de la sous-population observée. Leur production de cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, GM-CSF) est accrue. L'injection de CTLA-4-Ig chez des souris déficientes en cette protéine permet de prévenir le développement de cette prolifération lymphocytaire fatale et l'infiltration des organes. L'inhibition de la voie CTLA-4 peut entraîner le développement du diabète insulino-dépendant (DID) qui se caractérise par la génération de lymphocytes T spécifiques de protéines produites par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas (64). Dans le cas d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle d'étude de sclérose en plaques, l'injection de CTLA-4-Ig chez des souris après induction d'EAE prévient le développement de la maladie auto-immune (65). Ces résultats confèrent à CTLA-4 un rôle majeur dans la régulation négative de l'activation des lymphocytes T, mais aussi dans la maintenance de l'homéostasie lymphocytaire et le contrôle des lymphocytes T auto-réactifs et des maladies auto-immunes.

Le rôle de CTLA-4 chez l'homme est étayé par l'étude de polymorphismes génétiques de cette molécule, associés à la production de protéines d'une efficacité variable. Plus particulièrement, certains polymorphismes engendrent une diminution de la forme soluble de CTLA-4 et sont associés à une susceptibilité augmentée de développer des maladies auto-immunes. Ueda H *et al.* ont également rapporté la présence d'un épissage alternatif de CTLA-4 générant un variant de la protéine dont la capacité de liaison de CD80/CD86 est altérée. Les souris NOD surexprimant particulièrement cet épissage alternatif de CTLA-4 ont une susceptibilité augmentée à la survenue de diabète insulino-dépendant (66).

Le ciblage de CTLA-4 dans des thérapies immunomodulatrices fait actuellement l'objet de nombreuses études pour le traitement de certains cancers. Ainsi, une équipe californienne (67) a pu démontrer, dans un modèle murin de cancer de la prostate (TRAMP-C2), le rôle potentiel de CTLA-4. Après induction d'une tumeur métastatique puis résection, deux groupes de souris ont été générés. Un premier groupe fut traité par un anticorps contrôle et un second par un anticorps monoclonal neutralisant CTLA-4. Le nombre de récurrences métastatiques est alors réduit de 97 à 44% avec l'anticorps anti-CTLA-4. Chez l'homme, des études cliniques sont en cours et les premiers résultats tendent à conforter les données des modèles murins.

La modulation de CTLA-4 peut aussi donner lieu à une induction de tolérance et la création d'un environnement favorable à la greffe de moelle osseuse et d'organe (ceci dépasse le sujet de cette revue).

## Rationnel préclinique

L'utilisation d'anticorps neutralisant CTLA-4 dans des modèles murins permet l'obtention de régression de métastases établies ou la prévention de l'apparition de cancers dans des modèles de mélanomes, de fibrosarcomes, de cancers de la prostate (68-71). Dès les années 1999, van Elsas *et al.* démontrèrent dans un modèle de mélanome murin l'intérêt de l'utilisation d'un anticorps neutralisant CTLA-4 avec un objectif thérapeutique (72). Ces auteurs ont établi une procédure vaccinale, associant un traitement par anticorps neutralisant CTLA-4 et l'administration d'une lignée de mélanome irradiée (B16) exprimant le GM-CSF. Ces auteurs démontrèrent que l'association de vaccination thérapeutique était efficace et permettait l'éradication de micrométastases du mélanome murin (B16), établies dans des souris C57/BL6. La régression des tumeurs était corrélée à l'apparition d'une immunité mémoire prévenant l'implantation ultérieure de ce mélanome. Des symptômes auto-immuns comprenant une dépigmentation furent observés. L'efficacité de la vaccination dans le modèle de souris portant des métastases de B16 dépendait des lymphocytes T CD8+. Au contraire, dans un modèle de vaccination préventive, l'efficacité du traitement par anti-CTLA-4 était indépendante des lymphocytes T CD8 et nécessitait la présence de lymphocytes T CD4.

Afin de distinguer l'implication de CTLA4 dans l'immunité dépendant des lymphocytes T CD8 et CD4, Gattinoni *et al.* ont élaboré un modèle murin déficitaire en CTLA4, dont les lymphocytes T CD8 sont transgéniques pour un TCR et reconnaissent un antigène nominal (pmel-1 : antigène mélanocytaire). Ces souris développent rapidement un vitiligo sévère et une immunité anti-mélanome efficace. L'ablation des lymphocytes T CD4 (non transgéniques) altère l'immunité antitumorale dépendant des lymphocytes T CD8 et diminue l'incidence des vitiligos. Ainsi, les mécanismes effecteurs des traitements neutralisant CTLA-4 sont complexes et impliquent également de manière non spécifique une augmentation des fonctions auxiliaires des lymphocytes T CD4. Ceci pourrait expliquer en partie le large spectre des maladies auto-immunes observées chez les patients traités par ces stratégies.

## Données cliniques

Ces différentes données furent transcrites dans la recherche clinique. La neutralisation de CTLA-4 permet d'obtenir 15 à 20 % de réponses objectives dans les protocoles dédiés aux mélanomes métastatiques (tableau IV). Deux anticorps monoclonaux neutralisant CTLA-4 sont en cours de développement (ipilimumab [MDX-010] et ticilimumab). Les patients traités par anticorps neutralisant CTLA-4 ont présenté des toxicités de grade III-IV incluant des vitiligos, des dermatites, des néphrites, des hypophysites et des colites inflammatoires. Plusieurs études rapportent une corrélation entre l'efficacité thérapeutique et la survenue de symptômes auto-immuns.

Phan GQ *et al.* publièrent en 2003 les résultats concernant 14 patients porteurs de mélanomes métastatiques traités par anticorps neutralisant CTLA-4 (ipilimumab) et vaccination sous-cutanée utilisant des peptides de gp100 (73). Quarante-trois pour cent des patients ont présenté une toxicité auto-immune de grade III ou IV associant essentiellement dermatite, entérocolite, hépatite et syndrome hypophysaire. Ces toxicités furent réversibles par traitement en corticothérapie. Le taux de réponses objectives était de 23 % (2 réponses complètes et 1 réponse partielle). Ces résultats furent confirmés par cette équipe dans une cohorte de 56 patients porteurs de mélanome de stade IV en situation d'échappement thérapeutique (JCO 2005). Ces 56 patients furent également traités par vaccination sous-cutanée utilisant des peptides de gp100 et ipilimumab. Le taux de réponses objectives était de 13 % incluant deux réponses complètes et cinq réponses partielles. Trente-six pour cent des patients qui présentèrent des toxicités auto-immunes de grade III-IV ont bénéficié de réponses objectives, alors que les auteurs ne rapportent que 5 % de régressions tumorales objectives chez les 42 patients sans symptômes auto-immuns ( $p = 0,008$ ). Cette équipe a ainsi établi l'efficacité des stratégies d'immunothérapie basée sur la neutralisation du CTLA-4. L'obtention de manifestations auto-immunes lors de l'utilisation de l'ipilimumab est un facteur prédictif de son efficacité. La régression spontanée

**Tableau IV –**



de ces toxicités a justifié un plus ample développement clinique de cette molécule dans cette pathologie sans ressource thérapeutique.

Dans une autre étude, 19 patients opérés de manière radicale pour des mélanomes de stade III ou IV ont été traités par vaccination peptidique (gp100 et MART1) et ipilimumab (74). L'anticorps anti-CTLA-4 fut administré selon une escalade de doses, toutes les quatre semaines pendant six mois puis toutes les douze semaines pendant six mois supplémentaires. Dans cette configuration, la dose maximale tolérée est de 1 mg/kg. Huit patients ont présenté des dermatites ou entérocolites de grade III-IV. Trois de ces patients récidivèrent. À l'inverse, 9 des 11 patients n'ayant pas subi de toxicité auto-immune récidivèrent.

Une récente revue de 198 patients traités par ipilimumab pour des mélanomes métastatiques ou des carcinomes rénaux a confirmé l'efficacité clinique de cette molécule avec un taux de réponse objective de 14% sur cette large cohorte de patients. La toxicité principale fut une entérocolite survenant chez 21% des patients et consistant en des épisodes de diarrhées de grade III et IV. Les biopsies digestives ont révélé la présence d'un infiltrat lymphocytaire de la muqueuse digestive. Ces symptômes furent sensibles à la corticothérapie pour la majorité des patients. Néanmoins, cinq patients subirent une colectomie secondairement à une perforation digestive. Cinq autres patients ayant développé des entérocolites résistant à la corticothérapie furent traités avec succès par anticorps neutralisant le TNF- $\alpha$ . Les auteurs n'ont pas observé d'interférence entre le traitement par corticoïdes et l'efficacité clinique (75). Le taux de réponses objectives était de 36% et de 35% pour les patients porteurs de mélanomes ou de cancers du rein et ayant présenté des colites inflammatoires. En l'absence de manifestations auto-immunes, les taux de réponses objectives furent respectivement de 11% et 2% chez ces patients.

Un second anticorps neutralisant CTLA-4 fut développé (ticilimumab). Trente-quatre patients porteurs de mélanomes métastatiques, 4 patients porteurs de cancers du rein et 1 patient porteur d'un adénocarcinome colique furent inclus dans une première étude de phase I évaluant l'intérêt d'un traitement par ticilimumab seul (76). Une dose maximale de 15 mg/kg fut administrée. Ce traitement fut également associé à des manifestations auto-immunes de type colites inflammatoires, vitiligos, dermatites, panhypopituitarisme, hypothyroïdie. Les auteurs rapportèrent deux réponses complètes et deux réponses partielles durables (25 et 26 mois). Ces réponses furent observées majoritairement pour le palier de dose supérieure, suggérant un effet dose pour cette molécule, à considérer pour la réalisation des prochains essais thérapeutiques.

Une autre approche thérapeutique a également consisté en l'association de la neutralisation du CTLA-4 et d'un traitement par IL-2 (77). Trente-six patients porteurs de mélanomes métastatiques furent ainsi traités par IL-2 (720 000 UI/8 h, IV pour un maximum de 15 injections) et par ipilimumab. Trois patients bénéficièrent de réponses complètes et les auteurs notèrent cinq réponses partielles, soit un taux de réponse objective de 22%. Quarante pour cent des patients ont développé des symptômes auto-immuns, principalement à type de colite inflammatoire. Cette étude montre que l'association de

l'interleukine 2 et de la neutralisation du CTLA-4 est faisable. Néanmoins, les résultats cliniques n'indiquent pas une synergie entre ces deux molécules et n'incitent pas à la poursuite de ce développement.

## Leçons issues du suivi immunologique des patients

Les différents protocoles évaluant l'intérêt de l'ipilimumab ou du ticilimumab pour la neutralisation du CTLA-4 furent associés à un suivi biologique des réponses immunitaires. Le CTLA-4 étant exprimé sur les lymphocytes T activés et de manière constitutive sur les lymphocytes T régulateurs, deux effets biologiques principaux pouvaient être attendus. Les données précliniques suggèrent que l'inhibition de CTLA-4 abaisse le seuil d'activation des lymphocytes T CD4 et T CD8. Un deuxième effet potentiellement envisageable est la déplétion des lymphocytes T régulateurs, ce qui est suggéré par la survenue de colites inflammatoires habituellement observées lorsque ces lymphocytes régulateurs sont déficients (IPEX, Powrie).

Maker *et al.* ont évalué les réponses immunes d'une cohorte de patients traités par ipilimumab (78). L'inhibition de CTLA-4 chez ces patients n'a pas affecté le nombre ou les fonctions des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+FOXP3+. À l'inverse, l'expression de marqueurs d'activation comme HLA-DR était augmentée, suggérant que l'effet principal de cette molécule est de potentialiser l'activation des lymphocytes T effecteurs.

Reuben *et al.* ont effectué une analyse similaire dans une cohorte de patients traités par ticilimumab (79). Ces auteurs suggèrent que les patients bénéficiant d'une activité thérapeutique du ticilimumab ont un taux de lymphocytes T régulateurs et une production d'IL-10 qui diminuent sous traitement. Les lymphocytes T conventionnels de ces patients ont une capacité de production d'IL-2 augmentée. Ainsi, ces résultats restent préliminaires et la recherche de biomarqueurs associés à l'efficacité de ces traitements doit constituer un enjeu majeur des protocoles en cours de réalisation.

Une autre perspective intéressante provient de l'amélioration des modèles pré-cliniques utilisables pour la sélection des anticorps thérapeutiques neutralisant le CTLA-4. Cette approche pourrait permettre d'amener au stade de la recherche clinique des anticorps inhibant CTLA-4 et pourvu d'un meilleur index thérapeutique. En effet, Lute *et al.* ont produit des souris dont la molécule CTLA-4 fut partiellement humanisée (80). Dans ce contexte, CTLA-4 reste fonctionnel chez ces souris, mais peut être reconnu et neutralisé par des anticorps ciblant CTLA-4 humain. Plusieurs anticorps neutralisant CTLA-4 furent ainsi développés et analysés pour leur toxicité et efficacité clinique dans ce modèle. Ces auteurs ont démontré que certains de ces anticorps peuvent prévenir la croissance de mélanomes sans engendrer de réponses auto-immunes cliniquement significative.



## Conclusion

Les stratégies d'immunomodulation du système immunitaire font maintenant partie de l'arsenal thérapeutique de l'oncologie médicale. Une stimulation excessive du système immunitaire n'est pas sans risque pour le patient (voir les réactions auto-immunes associées au traitement par anticorps anti-CTLA-4). Ces complications peuvent être réduites en développant des modèles précliniques adéquats, mais aussi en assurant un suivi biologique approprié des patients traités par biothérapie. Les réactions auto-immunes semblent moins problématiques avec l'utilisation des ligands de TLR sur la base des études réalisées et aussi peut-être de l'utilisation locale de certains ligands (imiquimod). L'autre intérêt des ligands de TLR est leur effet direct sur les cellules tumorales. L'efficacité clinique corrélée à l'utilisation d'anticorps neutralisant CTLA-4 suggère également que les traitements interférant avec la tolérance immunologique (à l'échelle cellulaire ou moléculaire) sont un préalable important au développement des stratégies d'immunothérapie anti-tumorale.

## Références

1. Stephen CL, Gough SCL, Walker L.S.K, Sansom DM (2005) CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev* 204: 102-15
2. Lemaître B (2004) The road to Toll. *Nat Rev Immunol* 4: 521-7
3. Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045
4. Gallucci S, Matzinger P (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13: 114-9
5. Srivastava PK (2005) Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-peptide complexes. *Curr Oncol Rep* 7: 104-8
6. Shi Y, Evans JE, Rock KL (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516-21
7. Killeen SD, Wang JH, Andrews EJ, *et al.* (2006) Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a doubled-edged sword? *Br J Cancer* 95: 247-52
8. van Duin D, Medzhitov R, Shaw AC (2006) Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol* 27: 49-55
9. Huang B, Zhao J, Li H, *et al.* (2005) Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* 65: 5009-14
10. Migglin SM, O'Neill LA (2006) New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol* 80: 220-6
11. Parker LC, Prince LR, Sabroe I (2007) Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* 147: 199-207
12. Suttmuller RP, Morgan ME, Netea MG, *et al.* (2006) Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* 27: 387-93
13. Hopkins PA, Sriskandan S (2005) Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 140: 395-407

14. Schmausser B, Andrusis M, Endrich S, *et al.* (2005) Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 295: 179-85
15. Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5: 987-95.
16. Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13: 816-25
17. Seki E, Tsutsui H, Nakano H, *et al.* (2001) Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J Immunol* 166: 2651-7
18. Tsan MF (2006) Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Semin Cancer Biol* 16: 32-7
19. Perabo FG, Muller SC (2004) Current and new strategies in immunotherapy for superficial bladder cancer. *Urology* 64: 409-21
20. Krieg AM (2006) Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 5: 471-84
21. Miyazaki J, Kawai K, Oikawa T, *et al.* (2006) Uroepithelial cells can directly respond to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin through Toll-like receptor signalling. *BJU Int* 97: 860-4
22. Kelly MG, Alvero AB, Chen R, *et al.* (2006) TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 66: 3859-68
23. Klaffenbach D, Rascher W, Rollinghoff M, *et al.* (2005) Regulation and signal transduction of toll-like receptors in human chorioncarcinoma cell lines. *Am J Reprod Immunol* 53: 77-84
24. Hassan F, Islam S, Tumurkhuu G, *et al.* (2006) Intracellular expression of toll-like receptor 4 in neuroblastoma cells and their unresponsiveness to lipopolysaccharide. *BMC Cancer* 6: 281
25. Molteni M, Marabella D, Orlandi C, Rossetti C (2006) Melanoma cell lines are responsive in vitro to lipopolysaccharide and express TLR-4. *Cancer Letter* 235: 75-83
26. Li K, Chen Z, Kato N, *et al.* (2005) Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J Biol Chem* 280: 16739-47
27. Lang KS, Georgiev P, Recher M, *et al.* (2006) Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *J Clin Invest* 116: 2456-63
28. Salaun B, Coste I, Risoan MC, *et al.* (2006) TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 176: 4894-901
29. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5: 446-58
30. Stockfleth E, Trefzer U, Garcia-Bartels C, *et al.* (2003) The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. *Br J Dermatol* 149 Suppl 66: 53-6
31. Schulze HJ, Cribier B, Requena L, *et al.* (2005) Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. *Br J Dermatol* 152: 939-947
32. Speiser DE, Lienard D, Rufer N, *et al.* (2005) Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 115: 739-46
33. Friedberg JW, Kim H, McCauley M, *et al.* (2005) Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide (1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma: increased interferon-alpha/beta-inducible gene expression, without significant toxicity. *Blood* 105: 489-95
34. Pashenkov M, Goess G, Wagner C, *et al.* (2006) Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24: 5716-24
35. Carpentier A, Laigle-Donadey F, Zohar S, *et al.* (2006) Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncol* 8: 60-6

36. Byrd-Leifer CA, Block EF, Takeda K, *et al.* (2001) The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol* 31: 2448-57
37. June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB (1994) The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 7: 321-31
38. Egen JG, Allison JP (2002) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16: 23-35
39. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14: 233-58
40. Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, *et al.* (1997) Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 5: 583-9
41. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, *et al.* (1996) Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 6: 535-43
42. Rudd CE, Schneider H (2003) Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 3: 544-6
43. Lin H, Rathmell JC, Gray GS, Thompson CB, *et al.* (1998) Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4) Blockade Accelerates the Acute Rejection of Cardiac Allografts in CD28-deficient Mice: CTLA4 Can Function Independently of CD28. *J Exp Med* 188: 199-204
44. Masteller EL, Chuang E, Mullen AC, *et al.* (2000) Structural Analysis of CTLA-4 Function In Vivo. *J Immunol* 164: 5319-27
45. Marengere LE, Waterhouse P, Duncan GS, *et al.* (1996) Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science* 272: 1170-3
46. Schneider H, Prasad KV, Shoelson SE, Rudd CE (1995) CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J Exp Med* 181: 351-5
47. Chuang E, Fisher TS, Morgan RW, *et al.* (2000) The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13: 313-22
48. Guntermann C, Alexander DR (2002) CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4+ T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr319 phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases. *J Immunol* 168: 4420-29
49. Calvo CR, Amsen D, Kruisbeek AM (1997) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) interferes with extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Jun NH2-terminal kinase (JNK) activation, but does not affect phosphorylation of T cell receptor  $\zeta$  and ZAP70. *J Exp Med* 186: 1645-53
50. Krummel MF, Allison JP (1996) CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 183: 2533-40
51. Cazzolli R, Carpenter L, Biden TJ, Schmitz-Peiffer C (2001) A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase C $\zeta$ , in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* 50: 2210-18
52. Resjo S, Goransson O, Harndahl L, *et al.* (2002) Protein phosphatase 2A is the main phosphatase involved in the regulation of protein kinase B in rat adipocytes. *Cell Signal* 14: 231-38
53. Baroja ML, Vijaykrishnan L, Bettelli E, *et al.* (2002) Inhibition of CTLA-4 function by the regulatory subunit of serine/threonine phosphatase 2A. *J Immunol* 168: 5070-78
54. Chikuma S, Imboden JB, Bluestone JA (2003) Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 1: 129-35
55. Martin M, Schneider H, Azouz A, Rudd CE (2001) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J Exp Med* 11: 1675-81
56. Fraser JH, Rincon M, McCoy KD, Le Gros G (1999) CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF- $\kappa$ B activity in activated T cells. *Eur J Immunol* 29: 838-44
57. Olsson C, Riesbeck K, Dohlsten M, Michaelsson E (1999) CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF- $\kappa$ B and AP-1 activity in mouse T cell blasts. *J Biol Chem* 274: 14400-5
58. Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, *et al.* (1999) CTLA-4-mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol* 162: 5813-5820

59. Mellor AL, Munn DH (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 10:762-74
60. Woo EY, Yeh H, Chu CS, *et al.* (2002) Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 9: 4272-6
61. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, *et al.* (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 1206-12
62. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, *et al.* (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 5: 405-413
63. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, *et al.* (1994) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 5: 541-547
64. Luhder F, Hoglund P, Allison JP (1998) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med* 3: 427-32
65. Croxford JL, O'Neill JK, Ali RR, *et al.* (1998) Local gene therapy with CTLA-4-immunoglobulin fusion protein in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 28: 3904-3916
66. Ueda H, Howson JM, Esposito L (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423: 506-11
67. Kwon E.D, Foster B.A, Hurwitz A.A, *et al.* (1999) Elimination of residual metastatic prostate cancer after surgery and adjunctive cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15074-79
68. Leach DR, Krummel MF, Allison JP (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271: 1734-6
69. Yang YF, Zou JP, Mu J, *et al.* (1997) Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages. *Cancer Res* 57: 4036-41
70. Kwon ED, Hurwitz AA, Foster BA, *et al.* (1997) Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8099-103
71. Shrikant P, Khoruts A, Mescher MF (1999) CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+ T cell- and IL-2-dependent mechanism. *Immunity* 11: 483-93
72. van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP (1999) Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190: 355-66
73. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, *et al.* (2003) Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8372-7
74. Sanderson K, Scotland R, Lee P, *et al.* (2005) Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J Clin Oncol* 4: 741-50
75. Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, *et al.* (2006) Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 24: 2283-9
76. Ribas A, Camacho LH, Lopez-Berestein G, *et al.* (2005) Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol* 23: 8968-77
77. Maker AV, Phan GQ, Attia P, *et al.* (2005) Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* 12: 1005-16

78. Maker AV, Attia P, Rosenberg SA, *et al.* (2005) Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 175: 7746-54
79. Reuben JM, Lee BN, Li C, *et al.* (2006) Biologic and immunomodulatory events after CTLA-4 blockade with ticilimumab in patients with advanced malignant melanoma. *Cancer* 106: 2437-44
80. Lute KD, May KF Jr, Lu PHuman, *et al.* (2005) CTLA4 knock-in mice unravel the quantitative link between tumor immunity and autoimmunity induced by anti-CTLA-4 antibodies. *Blood* 106: 3127-33
81. Habal N, Gupta RK, Bilchik AJ, *et al.* (2001) CancerVax, an allogeneic tumor cell vaccine, induces specific humoral and cellular immune responses in advanced colon cancer. *Ann Surg Oncol* 8: 389-401
82. Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H, *et al.* (1999) Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 353: 345-50
83. Shackleton M, Davis ID, Hopkins W, *et al.* (2004) The impact of imiquimod, a Toll-like receptor-7 ligand (TLR7L), on the immunogenicity of melanoma peptide vaccination with adjuvant Flt3 ligand. *Cancer Immun* 4: 9
84. Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, *et al.* (2004) Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 4: 1129-38
85. Laplanche A, Alzieu L, Delozier T, *et al.* (2000) Polyadenylic-polyuridylic acid plus locoregional radiotherapy versus chemotherapy with CMF in operable breast cancer: a 14 year follow-up analysis of a randomized trial of the Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (FNCLCC). *Breast Cancer Res Treat* 64: 189-91

**Bedel R.** Rationnel de l'utilisation thérapeutique de l'anti-IL-6. *Réflexions Rhumatologiques. Editions Springer, Vol. 13 Avril 2009*



# Rationnel de l'utilisation thérapeutique du blocage de l'IL-6

ROMAIN BEDEL<sup>(1)</sup>, CHRISTOPHE BORG<sup>(1)</sup>, JOHN WIJDENES<sup>(2)</sup>

1 : UMR645 INSERM / EFS / Université de Franche Comté, Service d'Oncologie médicale, CHU de Besançon

2 : Société Diaclone, Besançon

## résumé

L'IL-6 est une cytokine pléiotropique de 21 kDa produite par de nombreux types cellulaires (notamment lymphocytes T, B et cellules endothéliales). Elle influence les réponses immunitaires spécifiques des antigènes et les réactions inflammatoires en agissant sur la polarisation des lymphocytes T (Th2, Th17), la maturation des lymphocytes B et la production de chémokines. Collectivement, les activités biologiques de l'IL-6 en font l'un des médiateurs physiologiques majeurs des réactions de phase aiguë de l'inflammation.

## mots-clés

Interleukine-6  
Activité pro-inflammatoire  
Maturation des lymphocytes B  
Polarisation des lymphocytes T



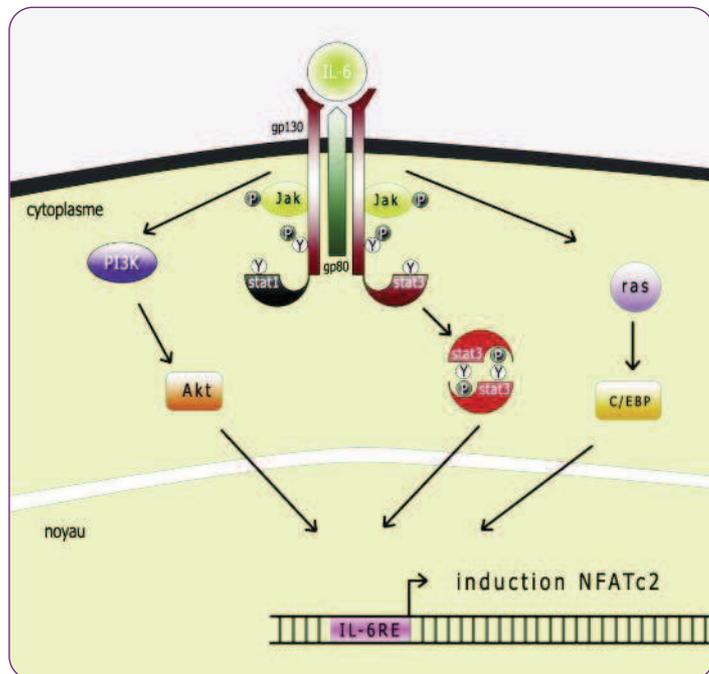
## Biologie cellulaire

L'interleukine 6 (IL-6) est un polypeptide de 21kDa comportant 212 acides aminés constituant 4 chaînes  $\alpha$ . Le gène de l'IL-6 est situé sur le chromosome 7p21. L'analyse des séquences régulant l'expression de ce gène identifie des séquences consensus pour la protéine AP-1 (*Activator Protein 1*), des éléments induits par l'AMPc et des éléments de réponse aux glucocorticoïdes. Cette configuration suggère un rôle de l'IL-6 dans les pathologies inflammatoires.

L'IL-6 est produite par de nombreux types cellulaires différents. Les principales sources *in vivo* sont les monocytes activés, les macrophages, les lymphocytes T et B, les granulocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules du muscle lisse, les éosinophiles, les chondrocytes, les ostéoblastes, les mastocytes, les cellules gliales et les kératinocytes. La production de l'IL-6 n'est pas spontanée, mais induite par des stimuli inflammatoires tels le lipopolysaccharide (LPS, ligand du *Toll like receptor*, TLR4), l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ). La seule exception est la production basale d'IL-6 par les adipocytes qui concourt à la détection chez le sujet sain de faibles concentrations d'IL-6 à l'aide de dosages ultrasensibles<sup>(1)</sup>.

Le récepteur à l'IL-6 (CD126 ou gp80) est composé d'un domaine extra-membranaire N-terminal et d'une chaîne transmembranaire. CD126 est exprimé de façon constitutive sur les monocytes et les macrophages. Le récepteur à l'IL-6 est exprimé par certaines sous-populations de lymphocytes. L'acquisition du CD126 après activation s'observe pour certains lymphocytes notamment les lymphocytes B. L'expression du CD126 est plus complexe sur les lymphocytes T, puisque 35% à 45% des lymphocytes T circulants au niveau sanguin l'expriment, alors que seulement 3% à 5% des lymphocytes T infiltrant les tissus le présentent<sup>(2)</sup>.

Le complexe formé entre l'IL-6 et son récepteur s'associe à une glycoprotéine transmembranaire, gp130 (CD130), qui est impliquée dans la transduction des signaux. Le CD130 est un récepteur commun de transduction de signaux pour la sous-famille des cytokines, incluant l'IL-6, l'IL-11, le LIF (*Leukemia Inducing Factor*), le CNTF (*Ciliary NeuroTrophic Factor*), l'oncostatine M, la NT-1 (*NeuroTrophin-1*), l'IL-27 et l'IL-31.



**Figure 1 :** Voies de signalisation de l'interleukine-6. La fixation de l'IL-6 sur son récepteur spécifique, CD126, engendre la dimérisation des chaînes transmembranaires gp130 et la transphosphorylation de tyrosines intracytoplasmiques. Les protéines de la famille Jak, STAT1 et STAT3 sont recrutées sur les chaînes intracytoplasmiques de gp130. La phosphorylation de STAT3 (Tyr705) par Jak2 permet la dimérisation de ce facteur de transcription et sa translocation nucléaire. Des voies de signalisation alternatives (ras, pi3K) sont possibles.

La fixation de l'IL-6 à son récepteur conduit à l'homodimérisation liée aux disulfides de gp130, à l'activation associée de la tyrosine kinase et à la cascade JAK (Janus Kinases) /STAT1/3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Figure 1). Des analyses cristallographiques ont suggéré une organisation hexamérique des complexes gp130 en présence du récepteur à l'IL-6<sup>(3)</sup>.

La molécule CD126 peut être sécrétée/clivée en une forme soluble et présente dans le sérum humain normal. Complexée avec l'IL-6, la forme soluble de CD126 peut engendrer l'homodimérisation de CD130 et agir comme un agoniste de CD130. La molécule CD130 existe également sous forme soluble présente dans le sérum humain normal et peut être liée au complexe CD126/IL-6 soluble. CD130 soluble agit alors comme un antagoniste de la bio-activité de l'IL-6. Le rôle de ces complexes et leur interférence avec l'activité de l'IL-6 n'est pas pleinement comprise mais le complexe sCD126/IL-6/sCD130 est, au moins *in vitro*, un fort inhibiteur de l'activité de l'IL-6.

Après dimérisation des 2 chaînes de gp130, les adaptateurs de la famille des Janus Kinases (Jak1, Jak2 et Tyk2) sont recrutés par gp130 (Figure 1). La partie intracytoplasmique de gp130 contient également des sites de liaison pour les facteurs de transcription STAT1 et STAT3. Ces facteurs de transcription sont alors phosphorylés, forment des dimères et sont transloqués dans le noyau où ils régulent l'activité transcriptionnelle des gènes cibles de l'IL-6<sup>(4)</sup>. La phosphorylation de STAT3 en position Tyrosine 705 aboutit à la dimérisation de 2 monomères de STAT via leurs domaines SH2. Les dimères de STAT3 se fixent ensuite sur des séquences d'ADN comportant des motifs consensus TCCN<sub>3</sub>GAA, plus particulièrement exprimés sur les promoteurs des gènes codant pour des protéines de la phase aiguë de l'inflammation. A noter qu'il existe des familles de protéines interférant avec STAT3. La protéine SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling) intervient en amont de la dimérisation de STAT3, alors que PIAS3 (protein inhibitors of activated STATs) prévient la liaison de STAT3 à l'ADN.

D'autres voies de signalisation furent décrites (Figure 1). L'activation de ras par les récepteurs de l'IL-6 pourrait induire le facteur de transcription C/EBP $\beta$ <sup>(5)</sup>. Il a également été suggéré une influence sur l'activité de la voie PI3-kinase/Akt favorisant la survie de nombreux types cellulaires.

## Activités biologiques

L'IL-6 est une cytokine pléiotropique influençant les réponses immunitaires spécifiques des antigènes et les réactions inflammatoires. C'est un des médiateurs physiologiques majeurs des réactions de phase aiguë de l'inflammation.

### ■ Implication dans l'hématopoïèse

L'IL-6 exerce une activité biologique sur les précurseurs hématopoïétiques. En synergie avec l'IL3, elle augmente le nombre de colonies de progéniteurs pluripotents lors de culture des progéniteurs hématopoïétiques en milieu semi-solide. L'IL-6 est un facteur de différenciation des lymphocytes B et est capable d'induire la maturation finale des lymphocytes B en plasmocytes s'ils ont été pré-activés par l'IL-4. Elle agit aussi comme thrombopoïétine qui induit la maturation des mégacaryocytes *in vitro* et augmente le taux de plaquettes *in vivo*. L'IL-6 a également été impliquée dans la différenciation des macrophages. Elle stimule l'activité des ostéoclastes et est un des modulateurs majeurs de croissance autocrine pour beaucoup de myélomes humains, lymphomes et d'une certaine manière de certains carcinomes comme les cancers du rein.

### ■ Implication dans la phase aiguë de l'inflammation

L'IL-6 a été initialement décrite comme un facteur produit par les lymphocytes T activés pour favoriser la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B. Par la suite, il s'est avéré que l'IL-6 n'influait que la production d'anticorps, sans affecter la prolifération des lymphocytes B. L'IL-6 peut également potentialiser l'activation des lymphocytes T en augmentant la production de l'IL-2 et de son récepteur.

Lors de la réponse inflammatoire aiguë, les hépatocytes sont stimulés pour augmenter la production de fibrinogène et de protéines de la phase aiguë, comme la CRP (*C reactive protein*). Des études sur des lignées hépatocytaires ont montré que l'IL-6 possédait une activité pro-inflammatoire en favorisant la production de ces protéines associées à la phase aiguë de l'inflammation et en réprimant la synthèse des protéines comme l'albumine.

Ces données furent confirmées par des modèles de souris transgéniques pour l'IL-6<sup>(6)</sup> chez lesquelles furent observées une hypergammaglobulinémie, une diminution de l'albuminémie, une augmentation constitutive des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, une augmentation des mégacaryocytes dans la moelle osseuse et des plasmocytes dans les organes lymphoïdes secondaires. Ce phénotype correspond à ce que l'on observe lors de syndromes inflammatoires installés chez l'homme.

Un autre élément étayant le rôle majeur de l'IL-6 dans l'inflammation est son influence sur le profil de chémokines présentes dans les tissus périphériques et sur les récepteurs de chémokines exprimés dans les infiltrats lymphocytaires T en présence d'IL-6. En effet, l'IL-6 induit la production de CCL2, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 et CXCL10. L'expression de CCR3, CCR4, CCR5 et CXCR3 est augmentée à la surface des lymphocytes T<sup>(7)</sup>.

La démonstration formelle de l'implication de l'IL-6 dans les processus inflammatoires complexes fut produite par les modèles de souris knock-out pour l'IL-6. L'absence d'IL-6 chez ces animaux prévenait l'induction des arthrites aiguës induites expérimentalement.

### ■ Rôle de l'IL-6 dans la polarisation des lymphocytes T CD4 (Figure 2)

Dès sa description initiale, l'IL-6 fut considérée comme un facteur de co-stimulation des lymphocytes T, capable de favoriser la prolifération de ces lymphocytes et leur survie en diminuant l'expression de la molécule cytotoxique Fas Ligand et en augmentant celle de la molécule anti-apoptotique bcl2. La protection des lymphocytes T par l'IL-6, de l'apoptose

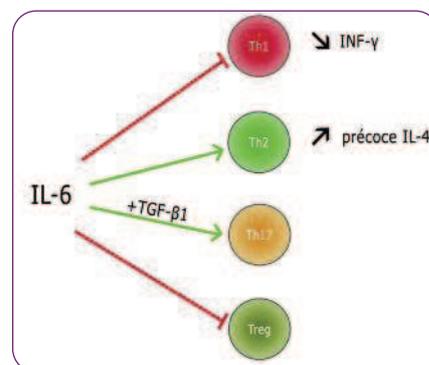
induite par l'activation, fut largement confirmée. *In vivo*, la présence d'IL-6 au moment d'une immunisation augmente le nombre de lymphocytes T mémoires générés.

La capacité de l'IL-6 à augmenter la production de NFATc2 (*Nuclear Factor of Activated T cells*)<sup>(8)</sup> et de c-maf a suggéré une influence de cette cytokine sur la polarisation des lymphocytes T CD4. Les 1<sup>ères</sup> études réalisées dans ce domaine ont mis en évidence une capacité de l'IL-6 à augmenter la production précoce de l'IL-4 et à diminuer la capacité des lymphocytes T à produire de l'interféron  $\gamma$ . Cette dernière propriété est directement associée à la production de SOCS1 (qui exerce une activité antagoniste sur la voie RIFN $\gamma$ /STAT1).

Les études portant sur les lymphocytes T régulateurs et TH17 ont contribué à l'élucidation du rôle de l'IL-6 dans la polarisation des lymphocytes T<sup>(9)</sup>. Les lymphocytes T TH17 peuvent être différenciés lors d'une stimulation antigénique, en présence d'IL-6 et de faibles doses de TGF- $\beta$ 1, ceci en l'absence d'IL-4 ou d'IFN- $\gamma$ . La polarisation des TH17 dépend du facteur de transcription ROR- $\gamma$ t (*retinoic acid-related orphan receptor-t*). L'IL-6 peut également promouvoir l'expression de l'IL-21, puis secondairement du récepteur à l'IL-23, ce qui amplifie la polarisation des lymphocytes T CD4 vers le profil TH17. Ces lymphocytes T TH17 peuvent induire des maladies inflammatoires et auto-immunes. Leur rôle est majeur dans la polyarthrite rhumatoïde.

A l'inverse, l'IL-6 peut avoir une influence négative sur les lymphocytes T régulateurs (Treg), exprimant le facteur de transcription Foxp3 et neutralisant la genèse de pathologies inflammatoires<sup>(10)</sup>. Dès 2003, il a été suggéré que la stimulation des cellules présentatrices d'antigènes par des récepteurs TLR (*Toll like receptor*) interférerait, via l'IL-6, avec les fonctions suppressives des Treg. Une étude complémentaire a également montré que la signalisation en *trans* de l'IL-6 (par le récepteur soluble de l'IL-6, le CD126), inhibait la conversion des lymphocytes T CD4 naïfs en Treg<sup>(11)</sup>. Cette signalisation en *trans* signifie que la production de CD126 soluble au voisinage

**Figure 2 :** Influence de l'interleukine-6 sur la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs. L'interleukine-6 peut influencer l'ensemble des modalités de polarisation des lymphocytes T CD4 et mener à la genèse d'un phénotype inflammatoire de la réponse immunitaire, la production de lymphocytes T Th17.



d'une cellule exprimant uniquement le CD130 permet en présence d'IL-6 d'activer la voie IL-6. La fonction de l'IL-6 dépend donc de l'expression du CD126 et de sa biodisponibilité. Ceci confirme l'intérêt de bloquer le CD126 pour inhiber la signalisation IL-6.



## Les questions à résoudre

La majeure partie des données concernant la biologie de l'IL-6 et de la polarisation des lymphocytes T TH17 implique une signalisation dépendante de STAT3 et un effet dans la genèse de maladies inflammatoire. Or, STAT3 serait aussi impliqué dans la différenciation des Treg<sup>(12)</sup>.

L'IL-6 est également produite par les cellules tumorales ou leur environnement et, dans ce contexte, porte un rôle immunosuppresseur. En effet, des 1<sup>ers</sup> travaux avaient indiqué que l'IL-6 contenue dans les surnageants de cellules de cancers du rein prévient la maturation des cellules dendritiques<sup>(13)</sup>. Ceci fut clairement confirmé par les travaux de Cheng et coll., qui ont établi que l'activation de STAT3 au sein des cellules dendritiques prévenait leur maturation et favorisait la production d'interleukine 10<sup>(14)</sup>.

Au sein des lymphocytes T CD4, l'expression de SOCS3 par transgenèse neutralise l'activité de STAT3 et confère un

caractère inflammatoire aux lymphocytes T CD4. Nous avons montré dans les lymphocytes T CD4 murins et humains que la costimulation par CD28 induisait directement, via Ick, la phosphorylation de STAT3 et la transcription de Foxp3<sup>(12)</sup>. Dans un modèle murin, l'inhibition de STAT3 au sein des lymphocytes T CD4 diminue le nombre de Treg et favorise l'immunosurveillance des cancers. De la même manière, les travaux de Kortylewski et coll. ont montré que l'ablation de STAT3 chez des souris portant des tumeurs induisait une restauration des réponses immunitaires innée et adaptative anti-tumorale<sup>(15)</sup>. Les cofacteurs de STAT3, lors des réponses immunitaires associées à l'inflammation ou à la tolérance, restent ainsi à déterminer.



## Conclusion

L'IL-6 joue un rôle important dans la réponse inflammatoire et l'activation du système immunitaire. Pour être provocateur et faire suite aux questions à résoudre, la neutralisation de cette cytokine pourrait aussi permettre de restaurer une réponse immunitaire dans le contexte de tumeurs et le blocage de la voie STAT3. Est-ce une piste pour le futur ? ■

Conflits d'intérêts : aucun

## RÉFÉRENCES

- 1- Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115 : 911-9.
- 2- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 2006; 80 : 227-36.
- 3- Somers W, Stahl M, Seehra JS. A crystal structure of interleukin 6 : implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J* 1997; 16 : 989-97.
- 4- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; 334 : 297-314.
- 5- Ramji DP, Vitelli A, Tronche F, Cortese R, Ciliberto G. The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL-6 and C/EBP delta/NF-IL6 beta, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucleic Acids Res* 1993; 21 : 289-94.
- 6- Suematsu S, Matsuda T, Aozasa K, et coll. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *PNAS* 1989; 86 : 7547-51.
- 7- Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, et coll. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 2001; 14 : 705-14.
- 8- Yang TT, Ung PM, Rincón M, Chow CW. Role of the CCAAT/enhancer-binding protein NFATc2 transcription factor cascade in the induction of secretory phospholipase A2. *J Biol Chem* 2006; 281 : 11541-52.
- 9- Zhou L, Ivanov II, Spolski R, et coll. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8 : 967-74.
- 10- Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299 : 1033-6.
- 11- Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C, et coll. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol* 2007; 179 : 2041-5.
- 12- Pallandre JR, Brillard E, Créhange G, et coll. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation : implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol* 2007; 179 : 7593-604.
- 13- Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, Blay JY. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells : role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 92 : 4778-91.
- 14- Cheng F, Wang HW, Cuenca A, et coll. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 2003; 19 : 425-36.
- 15- Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, et coll. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 2005; 11 : 1314-21.

**PERMIS D'IMPRIMER**

**THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT**

**DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE**

**EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° 25.10.05

Présentée par Madame, Monsieur **BEDEL ROMAIN**  
Né(e) le 11/03/83

et ayant pour titre : **ROLE DE STAT3 DANS L'IMMUNOEDITION TUMORALE :**  
**IMPLICATION DANS L'IMMUNOSURVEILLANCE NK.**

Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le 27 2010

Le Directeur de Thèse,



Le Président de l'Université  
et par délégation,  
Le Directeur de l'UFR SMP,



Le Professeur E. SAMAIN

