

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

UMR CNRS 7292 GICC : « Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer »

THÈSE

présentée par :

Laurie LAJOIE

soutenue le : **12 Juin 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

**Le FcγRIIIA/CD16A des cellules Natural Killer (NK)
humaines:**

**Régulation de son expression et variabilité des
réponses fonctionnelles induites par son engagement**

THÈSE dirigée par :

Pr. THIBAULT Gilles

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Dr. VÉLY Frédéric

Dr. WALZER Thierry

Maitre de Conférences Universitaire, Université d'Aix-Marseille

Directeur de recherche, INSERM, Lyon

JURY :

Pr. THIBAULT Gilles

Dr VÉLY Frédéric

Dr WALZER Thierry

Dr BRUHNS Pierre

Pr DIMIER-POISSON Isabelle

Pr MOREAU Thierry

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

Maitre de Conférences Universitaire, Université d'Aix-Marseille

Directeur de recherche, INSERM, Lyon

Directeur de recherche, Institut Pasteur, Paris

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

Science may set limits to knowledge, but should not set limits to imagination.

Bertrand Russell (*1872 – 1970*)

A Etienne, Evan et notre deuxième enfant à venir,

A ma famille, ma belle-famille et mes amis

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Vély et le Dr. Walzer d'avoir accepté de juger et d'évaluer mon travail de thèse. Recevez ici la marque de ma considération et de mon profond respect.

Je remercie également les autres membres du jury : le Dr. Bruhns d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse ainsi que le Pr Moreau d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et pour nos discussions scientifiques. Recevez tous deux ici la marque de mon profond respect.

Je remercie le Pr. Dimier-Poisson pour m'avoir soutenue depuis mon entrée au master « ICMV » et d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Ainsi la boucle est bouclée! Votre présence à la soutenance est pour moi un honneur, en tant que seule représentante de la gente féminine au sein des membres du jury et surtout parce vous avez su me donner ma chance il y a 6 ans. J'espère vous montrer aujourd'hui que vous n'avez pas à le regretter ! Recevez ici la marque de ma sympathie et de mon profond respect.

Je remercie le Pr. Paintaud pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche durant ces quelques années. Gilles, merci pour votre sympathie, votre écoute et votre soutien. Recevez ici la marque de ma sympathie et de mon profond respect.

Je remercie les membres du personnel hospitalier du laboratoire d'Immunologie pour leur soutien, leur sympathie et leur bonne humeur. Je remercie plus particulièrement Babette, Claude et Audrey pour leurs aides techniques, leurs disponibilités (et nombreux dépannages en anticorps fluorescents!). Ainsi, que les donateurs de sang, sans qui je n'aurais pu réaliser ce travail.

Je remercie l'ensemble de l'équipe 1, de l'UMR7292 et de MabImprove. Je remercie tout particulièrement (ceux encore présents ou déjà partis) : Hervé pour son soutien et sa sympathie ; Valérie pour sa gentillesse, son écoute, son soutien, ses conseils, nos conversations plus ou moins professionnelles ; Fabrice pour sa sympathie et sa bonne humeur ; David pour sa sympathie, son aide et ses précieuses explications dans le domaine des biostatistiques ; Les participants à la retraite scientifique de Chambon et du Mont Dore et plus particulièrement, Denis, Renaud, Gildas, Arnaud, Marc, pour leur sympathie et leur bonne humeur. Je pense que les flying tractor et Jean-Jacques resteront gravés dans nos mémoires à tous pour notre plus grand plaisir!

Merci aux doctorants (Ahmed, Jérôme, Laura, Colette, Mira, Dorothée), post-doctorants et ceux que j'ai côtoyés durant ces années, pour leur soutien, leur sympathie et nos conversations plus et (surtout) moins professionnelles. Pour les thésards : « Encore félicitation aux anciens et courage aux autres! ». Merci également à tous les stagiaires et étudiants que j'ai rencontrés tout au long de ces années dont Morgane, Claire, Lucille, Aurore, Suzanne, Mathieu.

Un énorme merci aux membres du 5^{ème} étage de Vialle sans qui ces années n'auraient vraiment pas été aussi agréables. Merci pour leur gentillesse, leur soutien, nos fous rires, tous les moments partagés au labo et en dehors. Plus particulièrement : Annie, Sandrine et Anne, pour leur bonne humeur, leur soutien, leur aide administrative, leur disponibilité, nos conversations aucunement scientifiques, nos séances de sport (sans rancune pour le body pump !); Nicolas, pour sa sympathie, son soutien, son aide informatique, nos conversations (et nos « pauses cigarettes »). Maxou « l'estomac sur pattes », pour sa gentillesse, son soutien, les moments partagés aussi en dehors du labo (sans oublier tes entrées discrètes dans le bureau !!!), William, pour sa sympathie et son soutien ; Nadine, pour ses conseils, son soutien, (ton couscous tunisien!); Cheng, pour sa gentillesse, ses nombreux conseils et aides scientifiques, sa rigueur, nos moments partagés au labo et en dehors, sans oublier ses délicieux gâteaux (j'en salive rien que d'y penser!); Calou, pour ses nombreux conseils scientifiques, sa légendaire bonne humeur, son dynamisme quotidien, son soutien, sa gentillesse (tes nombreux surnoms (« Mauricette », « loriculus », la « pétassiote », « la chieuse »...entre autres! et

désolé pour tous les envois de stylos non raté!) ; Christine « ma confidente », pour sa gentillesse, son soutien, son écoute, nos fous rires, son calme (que veux-tu, les opposés s'attirent !!) et le meilleur pour la fin, Plaket mon « co-thésard » préféré et « psychologue », notre « clavier humain » qui tape plus vite que son ombre pour nos parties de « tout le monde », un grand merci pour son soutien, son aide précieuse en informatique, nos fous rires, nos conversations « nocturnes » , nos dîners gastronomiques aux chandelles en ce lieu enchanteur que représente le bâtiment Vialle !, sa disponibilité, son écoute et tous les moments moins plaisants de la thèse que nous avons partagés. Merci d'avoir été un super co-thésard!!!

Un merci particulier à mon directeur de thèse, le Pr Gilles Thibault,

Tu as su par ta pédagogie, ta patience, ta gentillesse, ta rigueur, me diriger et me donner la force ainsi que l'optimisme nécessaire pour aller jusqu'au bout de ce projet de thèse.

Merci pour la confiance que tu m'as donnée, toutes les discussions passionnantes que nous avons eues, ton enseignement scientifique, ta disponibilité, ton enthousiasme communicatif.

Notre collaboration professionnelle a débutée de manière inattendue un jeudi soir de décembre 2010 et je considère que c'est une chance d'avoir pu travailler au côté du grand Professeur que tu es, tant pour ta pédagogie que pour ton savoir.

Notre rencontre en tant que personne restera également un excellent souvenir. Merci pour ton humanité, ton écoute, nos conversations plus personnelles, ton côté un peu paternel.

Reçois ici la marque de ma haute estime, de mon profond respect mais également de mon affection.

Un grand merci à ma famille (mon papa, ma maman, mes trois sœurs (Jennifer, Alice et Leslie), mes beaux-parents, mes beaux-frères, ma belle-sœur, mes neveux et nièces ; et bien d'autres, encore de ce monde ou non)

Merci également à tous mes amis (ceux présents depuis mon jeune âge, ceux avec qui je partage tous ces bons moments en dehors du travail, ceux du master « ICMV », ceux plus ou moins proche de moi lors de cette soutenance).

Merci à vous toutes et tous qui m'encouragent, me soutiennent et me supportent depuis toutes ces années.

Finalement, « Last but not least », un immense merci à Etienne et notre fils Evan, les deux hommes de ma vie. La thèse a parfois été un moment difficile pour vous. Elle est très preneuse de temps ! Et j'avoue ne pas vous avoir consacré le temps que vous méritez et dont vous avez besoin (surtout toi Evan). Merci pour votre soutien incommensurable, votre présence quotidienne à mes côtés même dans les moments les plus difficiles et votre amour inconditionnel. Merci de m'avoir supporté et encouragé durant la rédaction de ce manuscrit. Merci à notre deuxième bébé qui par sa présence m'a apaisé durant cette dernière ligne droite. Merci à vous 3 de faire partie de ma vie.

J'en ai probablement oublié encore et je m'en excuse.

Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable.

Résumé

Le FcγRIIIA/CD16A des cellules Natural Killer (NK) humaines : Régulation de son expression et variabilité des réponses fonctionnelles induites par son engagement

Les cellules *Natural Killer* (NK) humaines jouent un rôle central dans les défenses de l'hôte et la régulation du système immunitaire par leurs capacités à lyser les cellules tumorales, infectées, transplantées et/ou opsonisées par des anticorps mais aussi par la sécrétion de cytokine telle que l'IFN-γ. La majorité des cellules NK humaines circulantes expriment faiblement la molécule CD56 (cellules CD56^{dim}) et fortement le récepteur FcγRIIIA/CD16A, leur permettant d'exercer les fonctions effectrices dépendantes des anticorps (comme l'ADCC) en plus des fonctions effectrices naturelles. L'état d'activation des cellules NK est finement régulé par l'intégration d'une balance de signaux provenant de récepteurs activateurs (RAs) et inhibiteurs (RIs) spécifiques des molécules du CMH de classe I du soi. Les RIs incluent principalement le récepteur hétérodimérique de la famille des lectines de type C, le NKG2A/CD94 qui reconnaît les molécules HLA-E et les récepteurs KIR (Killer Ig-like receptor) tels que le KIR2DL1/CD158a et le KIR3DL2/3/CD158b spécifiques des molécules HLA-C. L'expression des molécules du CMH-I diminue à la surface des cellules cibles en état de stress (transformation tumorale, infection). La réduction des signaux inhibiteurs délivrés par l'engagement des RIs au profit de ceux provenant de la reconnaissance des ligands de stress par les RAs entraîne l'activation de la cellule NK et le déclenchement des fonctions effectrices.

L'activation des cellules NKCD56^{dim} par l'engagement du FcγRIIIA/CD16A par un anticorps anti-CD16 ou par le rituximab ou le trastuzumab, ou sans engagement du récepteur, lorsque les cellules NK sont incubées avec des cellules K562 sensibles à leur lyse ou après stimulation par un ester de phorbol, entraîne une modulation de son expression membranaire par un mécanisme enzymatique faisant intervenir une métalloprotéase non identifiée au début de ce travail. Par une approche moléculaire, nous avons montré que la métalloprotéase ADAM17 clive la protéine FcγRIIIA/CD16A au niveau de la partie juxta-membranaire spécifiquement entre l'Alanine 195 et la Valine 196. Après avoir confirmé la présence d'ADAM17 à la surface des cellules NK et au niveau intracellulaire, nous avons montré que la stimulation des cellules NK par le N-éthylmaléimide et le PMA induit la modulation simultanée du FcγRIIIA/CD16A et du CD62L, un substrat connu d'ADAM17 exprimé sur une fraction des cellules NK. En outre, nous avons validé le fait que l'inhibition spécifique

d'ADAM17 prévient la modulation d'expression des deux molécules. L'étude simultanée de la dégranulation de la production d'IFN- γ et de l'expression membranaire du F γ RIIIA/CD16A à la surface des cellules NKCD56^{dim} activées par le co-engagement de leurs RAs a révélé 1) que les réponses fonctionnelles augmentent avec le nombre de RAs engagés 2) qu'indépendamment de son engagement la modulation du F γ RIIIA/CD16A est un marqueur d'activation des cellules NK plus fortement corrélée à la dégranulation qu'à la production d'IFN- γ . De plus, lorsqu'il est engagé, le F γ RIIIA/CD16A peut être à la fois clivé par ADAM17 et internalisé. Finalement, le mécanisme de clivage du récepteur dépendant d'ADAM17 agit exclusivement en *cis*.

Dans une seconde partie, nous avons observé que l'engagement du récepteur F γ RIIIA/CD16A ou le co-engagement des RAs des NKCD56^{dim} induisent de manière simultanée mais non corrélée la dégranulation et la production d'IFN- γ suggérant que ces deux réponses sont exercées par des sous-populations partiellement distinctes de cellules NKCD56^{dim}. Par une approche de cytométrie en flux, nous avons pu analyser l'expression des RIs sur les cellules NKCD56^{dim} répondant exclusivement par la dégranulation ou par la production d'IFN- γ ou produisant les deux réponses, après l'engagement du F γ RIIIA/CD16A ou des RAs. La dichotomie fonctionnelle varie selon les donneurs et dépend de l'expression des RIs spécifiques des molécules du CMH-I. Ainsi, la production d'IFN- γ est associée à l'expression des KIRs (*Killer like-Immunoglobuline Receptor*) mais pas à celle du NKG2A après l'engagement du F γ RIIIA/CD16A ou des RAs.

Les anticorps monoclonaux sous forme d'immunocytokine sont développés afin d'augmenter les fonctions effectrices telle que l'ADCC des cellules NK dans les stratégies anti-tumorales. Dans la dernière partie, nous avons étudié, au cours d'une collaboration, les activités biologiques du rituximab couplé au niveau de la portion Fc à la protéine de fusion RLI, associant la forme soluble de l'IL-15R α humain à l'IL-15 humaine par le domain sushi. Nous avons particulièrement montré que la fusion de la molécule RLI à la portion Fc de l'anticorps anti-CD20 n'affecte pas sa reconnaissance par le récepteur F γ RIIIA/CD16A. De plus, les fonctions effectrices cytotoxiques *in vitro* de l'immunocytokine et du rituximab combiné au RLI (ADCC et activation des cellules NK) étaient augmentées. L'ensemble de ces travaux a permis de mieux comprendre les réponses effectrices dépendantes du F γ RIIIA/CD16A qui sont importantes pour améliorer l'efficacité thérapeutique des anticorps monoclonaux à visée anti-tumorale.

Résumé en anglais

The FcγRIIIA/CD16A of Human Natural Killer (NK) cells: regulation of expression and variability in the functional responses induced by its engagement.

Human Natural killer (NK) cells play a central role in host defense and immune regulation through their ability to lyse stressed target cells, including transformed, infected, transplanted and antibody-coated cells, and to produce cytokines such as IFN-γ. Most human circulating NK cells express low level of the CD56 molecule (NKCD56^{dim}) and high level of the FcγRIIIA/CD16A receptor involved in antibody-dependent effector functions (such as ADCC), which add to natural functions. The regulation of NK cell functions depends on a very fine balance between activatory signals mediated by activating receptors (ARs) and inhibitory signals mediated by inhibitory receptors (IRs) specific for self-MHC-I molecules. IRs mainly include C-type lectin NKG2A/CD94 heterodimer receptor that recognize HLA-E molecules and killer Ig-like receptor (KIR) such as KIR2DL1/CD158a, KIR2DL2/3/CD158b specific for HLA-C allotypes. The expression of MHC-I molecule is decreased on stressed target cell surface. The decreased inhibitory signals and the increased activatory signals due to the simultaneous engagement of ARs by stress ligands result in NK cell activation and trigger effector functions.

Activation of NK CD56^{dim} upon the engagement of FcγRIIIA/CD16A by anti-CD16 monoclonal antibody or by the Fc portion of rituximab or trastuzumab, as well as upon FcγRIIIA/CD16A-independent activation by K562 cells, or by phorbol ester, induces down-modulation of this receptor. The metalloprotease involved in the loss of FcγRIIIA/CD16A expression was not identified at the beginning of this work. We have used a molecular approach to show that the ADAM17 metalloprotease specifically cleaves the stalk region of FcγRIIIA/CD16A protein between the Alanine 195 and the Valine 196, whereas ADAM10 was inefficient. ADAM17 was found to be expressed on NK cells and stimulation by PMA or N-ethyl-maleimide resulted in the shedding of FcγRIIIA/CD16A and CD62-L, a specific ADAM17 substrate expressed on a fraction of NK cells. Moreover, we demonstrated that selective inhibition of ADAM17 prevents the shedding of both molecules. Simultaneous evaluation of degranulation, IFN-γ-production and FcγRIIIA/CD16A expression on activated NK CD56^{dim} upon the co-engagement of ARs revealed 1) that the functional responses

increase with the number of ARs engaged, 2) that upon F γ RIIIA/CD16A-independent activation, the shedding of F γ RIIIA/CD16A is a marker of NK cell activation more strongly correlated with degranulation than to IFN- γ -production. In addition, both ADAM17-dependent shedding and internalization were involved in F γ RIIIA/CD16A down-modulation when the latter was engaged. Finally, ADAM17-dependent shedding of F γ RIIIA/CD16A occurs exclusively in *cis*.

In the second part, we observed that the engagement of F γ RIIIA/CD16A or the co-engagement of ARs on NK CD56^{dim} induces simultaneous degranulation and IFN- γ -production. A partial segregation in the cells exhibiting each response was observed. Results of the kinetics of the responses indicate that they are performed by two distinct NKCD56^{dim} cell subsets. By a multi-colour flow cytometry approach, we analysed expression of IRs on degranulating and/or on IFN- γ -producing CD56^{dim} NK cells upon F γ RIIIA/CD16A engagement or ARs co-engagement. The functional dichotomy depends on the donor and on the expression of CMH-I-specific IRs. Indeed, IFN- γ -production is associated with KIRs (*Killer like-Immunoglobuline Receptor*) but not with NKG2A expression upon F γ RIIIA/CD16A or ARs engagement.

Immunocytokine (ICK) based on antibody-cytokine fusion protein are developed to enhance ADCC of NK cell in antitumor immunotherapeutic strategies. In the last part, we evaluated, in a collaborative study, the biological activities of rituximab coupled in its Fc portion to RLI, a soluble form of human IL-15R α linked to human IL-15 by a sushi domain. We particularly showed that fusing RLI to the anti-CD20 antibody did not alter the recognition by the F γ RIIIA/CD16A receptor. Moreover, the *in vitro* effector functions (ADCC and NK cell activation) of the immunocytokine and rituximab associated with RLI were increased compared to rituximab used alone. All together, these results contribute to a better understanding of the F γ RIIIA/CD16A-dependent functional responses, which are essential to improve the efficacy of monoclonal antibodies used in cancer therapy.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	10
Liste des abréviations.....	13
Liste des tableaux	16
Liste des figures	17
Liste des annexes	21
INTRODUCTION.....	22
I) Les anticorps monoclonaux à visée thérapeutique.....	23
a) Structure des IgG.....	23
b) Les différents formats de molécule d'anticorps	24
c) Mécanisme d'action	27
II) Les cellules NK humaines	34
1) Généralités.....	34
2) Profil phénotypique, localisation et maturation	34
3) Fonctions effectrices des cellules NK	37
a) Mécanisme de cytotoxicité.....	37
b) Production et sécrétion de chimiokines et de cytokines.....	39
4) Mécanisme de reconnaissance de la cellule cible et activation de la cellule NK.....	41
a) Les récepteurs inhibiteurs.....	42
b) Les récepteurs activateurs	46
5) Éducation des cellules NK : tolérance du soi et activation	53
a) Les premières théories.....	53
b) La théorie de l'Éducation ou « Licensing »	54
III) Les FcγR des cellules NK	56
1) Caractéristiques générales des FcγRs	56
2) Le FcγRIIB	57
3) Le FcγRIIC	58
4) Le FcγRIIIA ou CD16A	58
a) Structure et signalisation cellulaire	58

b) Expression cellulaire et fonctions	59
c) Polymorphismes	60
d) Les FcγR homologues	61
5) Mécanisme de régulation négative	62
a) Shedding	62
b) Internalisation	67
c) Trogocytose	68
OBJECTIFS.....	66
MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	72
Les lignées cellulaires NK.....	73
Les anticorps monoclonaux	73
Produits chimiques	74
Transfection shRNA ADAM17 dans la lignée NK92CD16	74
RT-PCR quantitative d'ADAM17.....	75
RÉSULTATS	76
Première partie : Le mécanisme de décapage du FcγRIIIA/CD16A dépendant d'ADAM17 à la surface des cellules NK humaines activées avec l'identification du site clivage et la relation avec l'activation cellulaire	77
Article n°1	77
Introduction	78
Résultats complémentaires de l'Article n°1	80
Introduction	80
Résultats.....	80
Discussion.....	83
Deuxième partie : Étude de la relation entre l'expression des récepteurs inhibiteurs et les réponses fonctionnelles (dégranulation et synthèse d'IFN-γ) des cellules NK CD56^{dim} activées par l'engagement du FcγRIIIA/CD16A.	85
Article n°2:	85
Introduction	86
Résultats complémentaires de l'Article n°2 :	88
Introduction	88
Résultats.....	88

Discussion.....	89
Troisième partie : Étude in vitro de l'effet d'une immunocytokine sur les fonctions effectrices des cellules NK humaines. (Travail collaboratif)	92
Article n°3:	92
Introduction	93
Résultats et discussion	93
DISCUSSION GÉNÉRALE	95
CONCLUSION.....	103
Résumé	136
Abstract.....	136

Liste des abréviations

A

ADAM: A Desintegrin And Metalloproteinase
ADCC: Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
ADN: Acide Desoxyribonucleotide
AICL: Activation-Induced C-type Lectin
ANOVA: Analysis of variance
ARN: Acide ribonucléique
APC: Allophycocyanine

B

BCR: B Cell Receptor
BIKE : BIspecific Killer Engagers

C

CD: Cluster de Différenciation
CDC: Cytotoxicity Complement Dependent
CEACAM1: Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule
CH: Constant Heavy
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV: Cytomégalovirus
CNV: Copy Number Variation
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CRP: Complement Regulatory Protein

D

DAF: Decay accelerating factor
DAG: Diacyl glycerol
DD: *Death Domain*
DISC: Death-Inducing Signalling Complex
DNAM-1: DXAX accessory molecule-1

E

EBV: Einstein Barr Virus
EC: Extracellular domain
EGF: Epidermal Growth Factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

F

Fab: Fragment antigen binding
FADD: Fas-Associated Death Domain
Fc: Fragment constant
FcγR: Fragment constant γ Receptor
FcRn: Récepteur neonatal
FITC: Fluorescein Isotocyanate

G

G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor

H

HAMA: Human anti-mouse antibody
HCMV: Human Cytomegalovirus
HLA: Human Leucocyte Antigen

I

ICAM: intracellular adhesion molecule
ICK: Immunocytokine
IFN: Interféron
Ig: Immunoglobuline
IL: Interleukine
IL6-R: Interleukin 6 receptor
IP3 : Inositol triphosphate

ITAM: Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif

ITIM Immunoreceptor Tyrosine based Inhibition Motif

K

KIR Killer like-Immunoglobulin Receptor

KSHV *Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*

L

LAMP: Lysosome Associated Membrane Protein

LAT: Linker of Activated T cell

LCL: Leucémie Lymphoïde Chronique

LCR: Leucocyte Receptor Complex

LDGCB: lymphome diffus à grandes cellules B

LES: Lupus Érythémateux Disséminé

LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen 1

LGL: Large Granular Lymphocyte

LILR: Leucocyte Immunoglobulin Like Receptor

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

M

MAC: Membrane Attack Complex

MAP Kinases: Mitogen Associated Protein Kinase

MCP: membrane cofactor protein

MFI: Mean Fluorescent Intensity

MICs: MHC-class-I-polypeptide-related sequence

MIP1- α : Macrophage Inflammatory Protein 1- α

MMP: Matrix Metalloproteinase

N

NCR: Natural Cytotoxicity Receptor

NCAM: Neural cell adhesion molecule

NEM: N-éthylmaléimide

NK: Natural Killer

P

PBMC: Peripheral Blood Monuclear Cell

PBL: Peripheral Blood Lymphocyte

PCR: Polymerase Chain Reaction

PC-PLC: phosphatidylcholine phospholipase C

PE: Phycoérythrine

PeCy: Phycoérythrine cyanyne

PIP2: Phosphatidy Inositol diphosphate

PLC γ : Phospholipase C γ

PMA Phorbol 12-Myristate-13-Acetate

R

RAET1: Retinoic acid early transcripts-1

RT: Reverse Transcriptase

RTX: rituximab

S

SCID: Severe combined immunodeficiency

SHP: Src-Homology 2-containing Inositol 5'Phosphatase

sh: short hairpin

SVMP: Snake Venom MetalloProteinases

T

TCR: T cell Receptor

TGF: Transforming Growth Factor

TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TNF: Tumor Necrosis Factor

TTZ: trastuzumab

U

ULBP: UL-16-binding protein

V

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

VIH-1 Virus Immunodéficience Humaine

VL Variable Light

Liste des tableaux

Tableau1 : Principaux bio-médicaments utilisés en France	33
---	----

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'une IgG1 humaine. (D'après Winter and Milstein, 1991).....	24
Figure 2 : Bio-médicaments produits à partir de la structure moléculaire d'une IgG1 humaine. (A) La portion Fc est couplée à une seconde protéine afin d'augmenter la demi-vie de cette dernière. La portion Fab est utilisée pour cibler un (B) ou plusieurs (C) antigène(s). La molécule entière d'IgG1 est utilisée non couplée (D) ou conjuguée à des radionucléotides, des agents cytotoxiques ou des cytokines (E). Les autres sous-classes d'IgG sont utilisées pour développer de nouveaux anticorps thérapeutiques (F).	26
Figure 3 : Humanisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques : Représentation cristallographique et schématique de l'optimisation structurale apportée aux anticorps monoclonaux thérapeutiques afin de minimiser leur immunogénicité et d'améliorer leurs propriétés pharmacologiques pour une meilleure efficacité de ces bio-médicaments in vivo. Le suffixe utilisé pour la dénomination commune internationale (DCI) est indiqué en rouge.	27
Figure 4 : Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux. ADCC, Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ; CDC, Cytotoxicité dépendante du complément. (d'après Congy-Jolivet et al., 2007)	28
Figure 5 : Représentation schématique de la voie classique du complément. Le recrutement de l'effecteur C1q par la portion Fc de l'anticorps fixé à sa cible entraîne la cascade du complément par la voie classique. Le complément est physiologiquement régulé par des protéines régulatrices (en rouge) et aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire. (D'après Probst et al, 2006, bulletin du cancer).	31
Figure 6 : Comparaison du profil des cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} en terme d'expression phénotypique des protéines de surface, des fonctions effectrices et de la localisation dans l'organisme. L'analyse par cytométrie en flux permet de déterminer, parmi les cellules NK CD56 ^{dim} et CD56 ^{bright} (d'après Cooper et al., 2001a), cinq sous-populations en fonction du niveau d'expression du CD56 et du CD16: CD56 ^{bright} CD16 ⁻ , CD56 ^{bright} CD16 ^{dim} , CD56 ^{dim} CD16 ⁻ , CD56 ^{dim} CD16 ⁺ et CD56 ⁻ CD16 ⁻ (Nagler et al., 1989).	37

Figure 7: Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps (ADCC). Le FcγRIIIA/CD16A exprimé à la surface des cellules NK va par la reconnaissance de la portion Fc de l'Ac fixé sur la cible permettre la formation de conjugués effecteur/cible et ainsi activer la cellule NK. Cette dernière possède des granules qui vont se polariser au niveau de la membrane cellulaire et déverser leur contenu cytolitique constitué de protéases à potentiel pro-apoptotiques comme la perforine et les granzymes entraînant la lyse de la cellule cible. Les glycoprotéines telles que le CD107a exprimées à la surface des granules sont redistribuées à la surface membranaire de la cellule NK lors du processus de dégranulation..... 38

Figure 8 : Propriété immunorégulatrice et «mémoire médiée par les cytokines» des cellules NK. Par la production de diverses cytokines, les cellules NK sont capables d'interagir avec les cellules dendritiques et de polariser la réponse immunitaire adaptative. Les cytokines produites par les cellules NK dépendent de la stimulation monokinique initiale qui interviennent dans la pré-activation des cellules NK..... 41

Figure 9 : Mécanisme de reconnaissance de la cible par les cellules NK. L'état d'activation des cellules NK résulte d'une balance de signaux provenant des récepteurs activateurs et inhibiteurs présents en surface. Ainsi l'intégration d'un signal activateur plus fort que le signal inhibiteur entraînera une activation de la cellule NK et donc une réponse fonctionnelle tandis qu'un signal inhibiteur plus fort que le signal activateur entraînera une inhibition de la cellule NK et donc la tolérance de la cellule cible. 42

Figure 10 : Principaux récepteurs inhibiteurs et activateurs de la cellule NK et leur ligand respectif. (Poster Eric Vivier et Sophie Ugolini, Nature Review Immunology, 2010)..... 52

Figure 11: Représentation schématique de la structure des récepteurs de la portion Fc des immunoglobulines G. (A) Les FcγR humains, avec les récepteurs exprimés à la surface des cellules NK dans les encadrés (B) Les FcγR murins. (D'après Bruhns, 2012) 57

Figure 12 : Schéma de l'interaction entre le domaine EC2 du FcγRIIIA/CD16A et la portion Fc de IgG avec la représentation cristallographique et l'agrandissement de la zone de contact des deux protéines contenant l'acide aminé responsable du polymorphisme FcγRIIIA-V158F (d'après **Sondermann et al., 2000**)..... 61

- Figure 13: Représentation du classement des 21 ADAMs fonctionnelles chez l'Homme en fonction de leur capacité. protéolytique et de leur expression tissulaire (d'après Edwards et al., 2008)..... 64**
- Figure 14: Représentation schématique de l'organisation de la structure multidomaine des métalloprotéases de la famille des ADAM (d'après Edwards et al., 2008). P = Prodomaine ; M = domaine métalloprotéase ; D = domaine désintégrine ; CR = domaine cystéine-rich ; EGF-like = domaine EGF-like ; TM = domaine transmembranaire ; C = queue cytoplasmique. 65**
- Figure 15 : Fonctions potentielles des ADAMs chez l'Homme (Reiss and Saftig, 2009). Les ADAMs jouent un rôle majeur dans la fertilité, le développement du système nerveux central (SNC) et cardiovasculaire chez l'individu sain. Toutefois la dérégulation de leurs fonctions peut être liée aux maladies inflammatoires, la progression de cancers ou encore aux maladies auto-immunes telle que l'arthrite rhumatoïde. 67**
- Figure 16 : Expression des transcrits ADAM17 de 35 lignées NK92 avant et après transfection du CD16humain et des shRNA ADAM17. Ratio ADAM17/G6PDG correspond à la valeur de cycle seuil obtenue pour ADAM17 (notre cible) par rapport à celle de la G6PDH (notre référence) pour une standardisation des valeurs. 81**
- Figure 17 : Perte d'expression du CD16 à la surface des cellules NK92 CD16 shRNA après activation. Les cellules (1.10⁶cellules/ml) ont été incubées en RPMI sans SVF ni IL2, dans la plaque sensibilisée par 5µg/mL d'anticorps anti-CD16 (3G8) ou par une combinaison d'anticorps ciblant les récepteurs activateurs NKG2D et NKp46 pendant 4hrs comme décrit précédemment (Congy-Jolivet et al., 2008), ou stimulées avec 0,2mM de N-éthylmaléimide pendant 15 minutes ou 1µg/ml de PMA pendant 2 heures à 37°C sous 5% de CO₂. L'expression du CD16 à la surface des deux lignées cellulaires de NK92 a été évaluée par cytométrie en flux. Les pourcentages de cellules ayant modulé le CD16 ont été calculé d'après la formule suivante : $\% = [(A-B)/A] \times 100$ où A correspond à la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du CD16 à la surface des cellules non stimulées et B à la MFI du CD16 à la surface des cellules stimulées. Le pourcentage moyen (n=5) obtenu pour la lignée du clone contrôle exprimant 100% des transcrits ADAM17 (blanc), du clone 3.9 exprimant environ 40% des transcrits ADAM17 (pointillé) et du clone 3.1 exprimant 10% des transcrits ADAM17 (noir) est indiqué pour chaque stimulation avec l'écart-type moyen..... 82**

Figure 18 : Perte d'expression de CD16 à la surface des cellules NK92 transfectées par le CD16 humain (NK92 hCD16) ou le CD16 humain muté au niveau du site de clivage (NK92 hCD16 (VA)) après activation. Les cellules (5.10^5 cellules/ml) ont été incubées en RPMI sans supplément en SVF ni en IL2, en absence ou en présence de 0,2mM de N-éthylmaléimide pendant 15 minutes ou de 1µg/ml de PMA pendant 2 heures à 37°C sous 5% de CO₂. L'expression du CD16 à la surface des deux lignées cellulaires de NK92 a été évaluée par cytométrie en flux. Les pourcentages de cellules ayant modulé le CD16 ont été calculé d'après la formule présentée dans la légende de la figure précédente..... 83

Figure 19: Relation entre l'expression des récepteurs inhibiteurs NKG2A, CD158b et CD158a et réponses fonctionnelles des cellules NK CD56^{dim} de 8 donneurs sains avant et après stimulation par l'engagement de leurs récepteurs activateurs NKG2A, NKp30, NKp46 et 2B4. Les cellules NK fraîchement purifiées ont été incubées 4hrs à 37°C dans une plaque de culture 96 puits sensibilisée par un mélange d'AcMo ciblant les récepteurs activateurs NKG2D, NKp30, NKp46 et 2B4. Pourcentage individuel des différentes populations de cellules NK NKG2A⁺ (A), CD158b⁺ (B) et CD158a⁺ (C) au sein des différentes population de cellules NK CD56^{dim}, *i.e.* le pourcentage de cellules avant stimulation (non stim), après stimulation (stim), cellules non répondeuses (DN : *Double Négative*), répondant exclusivement par la production d'IFN-γ (IFN-γ⁺), exclusivement par la dégranulation (CD107a⁺), par les deux types de réponse (DP : *Double Positive*) (n=8) (D) Représentation des Ratios correspondant aux pourcentages des cellules NKG2A⁺, CD158b⁺ ou CD158a⁺ au sein des cellules NK CD56^{dim} répondeuses par rapport au pourcentage de cellules NKG2A⁺, CD158b⁺ ou CD158a⁺ au sein des cellules NK CD56^{dim} totales. Les analyses des différences statistiques entre les populations de cellules CD56^{dim} ont été obtenues par comparaison multiple (test ANOVA sur mesures répétées avec correction de Bonferroni). ***P<0,001 ; **P<0,05 ; *P<0,01. 91

Liste des annexes

Annexe 1 : Article n°3.....	135
-----------------------------	-----

INTRODUCTION

I) Les anticorps monoclonaux à visée thérapeutique

a) Structure des IgG

Les IgG sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines d'environ 150kDa. Elles sont composées de deux chaînes légères (ou chaîne L, Light) identiques entre elles et de deux chaînes lourdes (ou chaîne H, Heavy) de type γ également identiques entre elles, liées par des ponts disulfure. Il existe quatre sous-types de chaîne γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, et $\gamma 4$) chez l'homme définissant les sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) toutes constituées d'un domaine variable VH (Variable Heavy) et trois domaines constants CH1, CH2 et CH3 (Constant Heavy). Les chaînes légères sont de deux types chez l'homme (κ et λ) et ne possèdent qu'un seul domaine variable VL (Variable Light) et un domaine constant CL (Constant Light). La région charnière (hinge) située entre le domaine CH1 et CH2 permet une grande flexibilité de l'immunoglobuline.

Une immunoglobuline et donc un anticorps qui en a la structure complète, est une molécule « bifonctionnelle » (Figure 1) constituée d'une portion Fab (Fragment antigen binding) correspondant à l'association des domaines VH-VL-CH1-CL et contenant les zones hypervariables (CDR : *Complementarity Determining Regions*) permettant la liaison à l'Ag et une portion Fc (Fragment cristalisable) constituée des domaines constants CH2-CH3 capable de recruter les effecteurs cellulaires par l'intermédiaire des récepteurs Fc γ exprimés à leur surface, ou encore l'effecteur protéique C1q du complément. Ces différents effecteurs peuvent alors exercer leur fonction sur l'antigène ou sur la cellule qui possède cet antigène.

La portion Fc des IgG permet également la fixation au FcRn (Récepteur néonatal au fragment Fc) impliqué 1) dans le recyclage pH-dépendant des IgG humaines, qui les préserve du catabolisme protéique par les cellules endothéliales (Firan et al., 2001) et explique leur longue demi-vie (21 jours) et 2) dans le passage à travers les épithéliums dont le passage transplacentaire des IgG de la mère au fœtus. Ce récepteur est formé d'une chaîne α structurellement proche des molécules du CMH de classe I, couplé à une molécule de β_2 -microglobuline indispensable pour son expression à la membrane de certaines cellules épithéliales, endothéliales, trophoblastiques et d'origine hématopoïétiques (Roopenian and Akilesh, 2007).

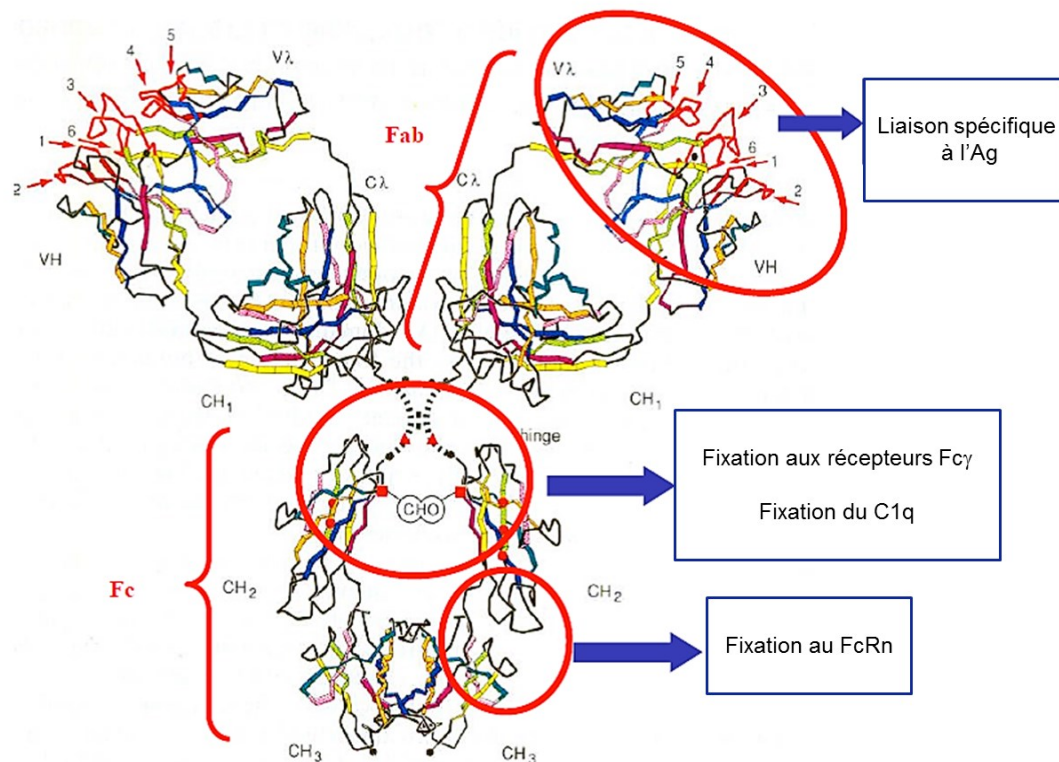


Figure 1 : Structure d'une IgG1 humaine. (D'après Winter and Milstein, 1991)

Les anticorps monoclonaux représentent les archétypes des thérapeutiques « ciblées » : l'effet thérapeutique repose dans tous les cas sur le fait que l'anticorps, en se fixant sur l'antigène dont il est spécifique, agit sur un processus physiopathologique dans lequel ce dernier est impliqué ou présent. Ils occupent aujourd'hui une place prépondérante dans le traitement des cancers et des maladies inflammatoires chroniques. Le muromomab, le premier apparu sur le marché, était une Immunoglobuline murine (IgG2a) produite par la technologie des hybridomes (Köhler and Milstein, 1975). Cette dernière consiste en l'immortalisation d'un clone de lymphocyte B de souris produisant un seul type d'anticorps et par conséquent reconnaissant un épitope unique. Depuis les nombreux progrès de l'ingénierie moléculaire ont permis l'obtention de différents formats d'anticorps même si la très vaste majorité de ceux actuellement utilisés en thérapeutique ont une structure d'IgG1 humaine.

b) Les différents formats de molécule d'anticorps

Bien que la structure des anticorps monoclonaux thérapeutiques soit actuellement basée principalement sur l'IgG1 humaine, de nouvelles molécules aux formats très divers ont également été développées. Elles peuvent être constituées de la protéine complète ou de tout ou partie de l'un des deux fragments selon l'effet recherché (Figure 2) puisque le format de la

molécule conditionnera ses propriétés pharmacologiques. À titre d'exemple, la présence de la portion Fc dans une molécule hybride permet d'en augmenter la demi-vie de par sa liaison au FcRn, et éventuellement de recruter les effecteurs de l'immunité.

La majorité des anticorps thérapeutiques sont « nus ». Toutefois, ils peuvent être couplés à des molécules actives comme les radio-isotopes (Y^{90} ibritumomab tiuxetan, Zevalin® et I^{131} tositumomab, Bexxar®) ou à une molécule cytotoxique (T-DM1, trastuzumab emtansine) afin de véhiculer l'agent actif directement sur son site d'action (Krop and Winer, 2014). Bien que ces derniers aient montré une meilleure activité anti-tumorale que celles des non conjugués, ils possèdent une importante toxicité (Davies, 2007). Actuellement, les études se tournent vers la formation d'anticorps couplé à des cytokines comme alternative à ces molécules (Pasche & Neri, 2012; Vincent *et al*, 2013). Parmi les nouvelles molécules constituées à partir d'un seul fragment de l'IgG₁, on retrouve les protéines de fusion qui utilisent la portion Fc des IgG₁ couplé à une autre protéine comme le récepteur du TNF (etanercept, Enbrel®) ou une forme soluble de la molécule CTLA-4 (abatacept, belatacept) et récemment la protéine TRAIL conjugué à la portion Fc d'une IgG₁ humain augmentant l'induction de l'apoptose (Wang et al., 2014). Le fragment Fab peut parfois suffire pour obtenir l'effet thérapeutique en particulier quand celui-ci est uniquement basé sur la neutralisation de l'antigène et que l'effet recherché doit être limité dans le temps, comme c'est le cas pour l'abciximab (Reopro® (cf *infra*)). Finalement, de nouveaux Ac thérapeutiques, dont le mécanisme d'action réside principalement sur la neutralisation de protéines solubles ou l'antagonisme de récepteurs membranaires, ont été développés à partir des autres sous-classes d'IgG tels que le natalizumab (Tysabri®), une IgG₄ ; le panitumumab (Vectibix®), une IgG₂ ; et l'eculizumab (Soliris®), une combinaison IgG₂/IgG₄.

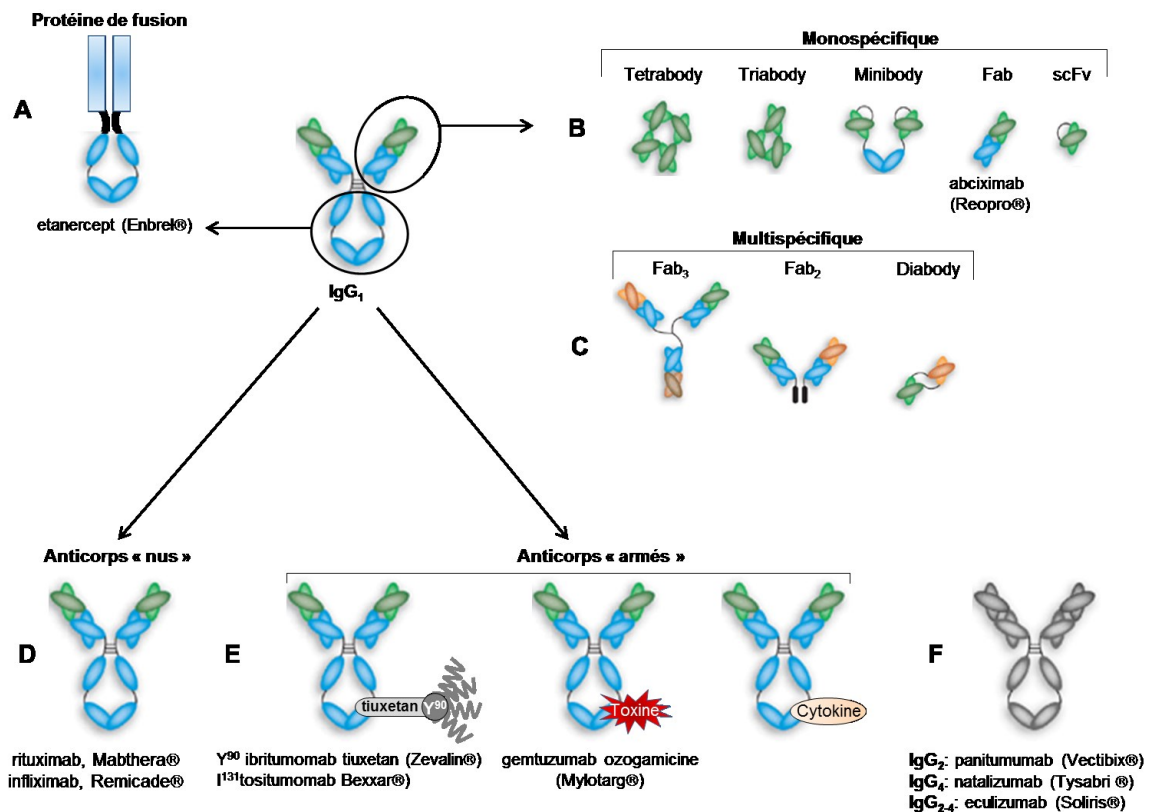


Figure 2 : Bio-médicaments produits à partir de la structure moléculaire d'une IgG1 humaine. (A) La portion Fc est couplée à une seconde protéine afin d'augmenter la demi-vie de cette dernière. La portion Fab est utilisée pour cibler un (B) ou plusieurs (C) antigène(s). La molécule entière d'IgG1 est utilisée non couplée (D) ou conjuguée à des radionucléotides, des agents cytotoxiques ou des cytokines (E). Les autres sous-classes d'IgG sont utilisées pour développer de nouveaux anticorps thérapeutiques (F).

Les nombreux progrès en génie génétique ont également permis de réduire considérablement l'immunogénicité des anticorps monoclonaux thérapeutiques par leur humanisation (Figure 3). Au cours de l'évolution de ces bio-médicaments, la part murine de la protéine a diminué au profit de la part humaine par le remplacement progressif des domaines constants, puis des régions charpentes des domaines variables. En effet l'injection d'un anticorps murin entraîne le développement d'une réponse humorale avec production d'anticorps humains anti-anticorps murin (HAMA : Human anti-mouse antibody) chez 38 à 83% des patients (Kimball et al., 1995) conduisant à la neutralisation de l'anticorps-médicament et donc à son inefficacité. De plus, les anticorps murins recrutent mal le complément et surtout les cellules effectrices humaines. Enfin, le FcRn humain a peu d'affinité pour les IgG2a et les IgG2b et aucune pour les IgG1 murines (Bruhns, 2012). L'humanisation des anticorps a ainsi permis d'augmenter leur efficacité *in vitro* et *in vivo*.

ainsi que leur durée d'action. Toutefois, une part d'immunogénicité due à l'idiotype reste présente y compris pour les anticorps intégralement humains.

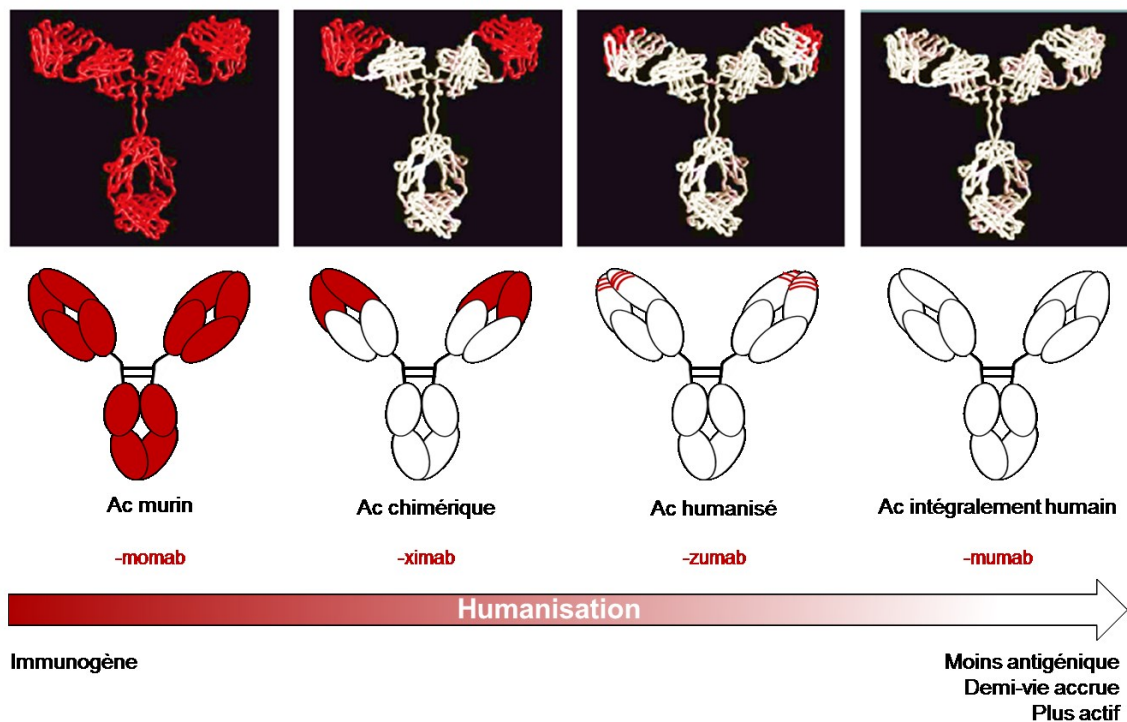


Figure 3 : Humanisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques : Représentation cristallographique et schématique de l'optimisation structurale apportée aux anticorps monoclonaux thérapeutiques afin de minimiser leur immunogénicité et d'améliorer leurs propriétés pharmacologiques pour une meilleure efficacité de ces bio-médicaments in vivo. Le suffixe utilisé pour la dénomination commune internationale (DCI) est indiqué en rouge.

c) Mécanisme d'action

Un anticorps monoclonal possède un ou plusieurs mécanismes d'action mettant en jeu la dualité structurale des IgG (Fab-dépendant et Fc-dépendant). (Figure 4)

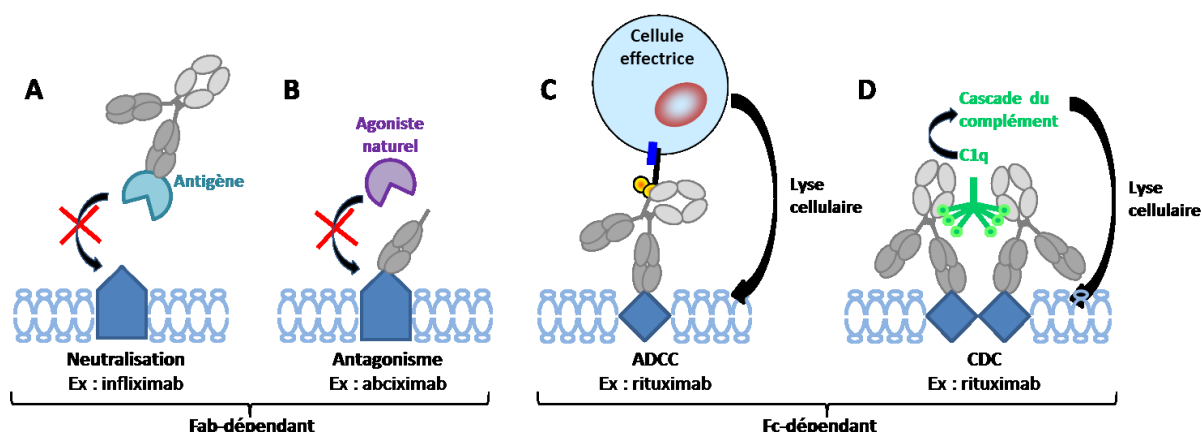


Figure 4 : Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux. ADCC, Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ; CDC, Cytotoxicité dépendante du complément. (d'après Congy-Jolivet et al., 2007)

▪ Mécanismes dépendant exclusivement de la portion Fab

Les mécanismes d'action dépendants de la portion Fab résultent de la seule fixation de l'anticorps sur l'antigène.

Neutralisation de l'antigène soluble : l'anticorps se lie à l'antigène soluble qui ne peut plus se fixer sur son récepteur naturel et exercer ses fonctions biologiques (Figure 4A).

Ce mécanisme concerne tous les anticorps anti-TNF- α tels que l'infliximab (Remicade®), une IgG1 chimérique et l'adalimumab (Humira®), une IgG1 humaine. Ces deux anticorps sont indiqués dans le traitement de diverses maladies à savoir la polyarthrite rhumatoïde, les rhumatismes psoriasiques, la spondylarthrite ankylosante et la maladie de Crohn.

Le bevacizumab (Avastin®), une IgG1 humanisée, se lie avec une forte affinité à toutes les isoformes du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Presta et al., 1997) et empêche ainsi sa fixation sur les récepteurs VEGFR1 (Flt-1) et VEGFR2 (Flk1/KDR) (Muller et al., 1998) inhibant la néo-angiogenèse. Il est indiqué dans le traitement de divers cancers (Tableau 1)

Antagonisme de récepteurs membranaires : l'anticorps bloque l'interaction avec le ligand et/ou leur fonctionnement (Figure 4B).

Le cetuximab (IMC-225, Erbitux®) est un Ac monoclonal chimérique qui se lie au domaine III du récepteur 1 à l'EGFR (EGFR1/erbB1). Il masque ainsi une partie du site de

liaison à ses ligands, l'EGF et le TGF- α , empêche la dimérisation du récepteur nécessaire à son activation et entraîne l'internalisation du récepteur erbB1 et donc une diminution de son expression membranaire à la surface des cellules tumorales (Li et al., 2005). La résultante de l'ensemble de ces mécanismes est la diminution de la transduction du signal de l'EGFR, l'activation de l'apoptose, une synthèse moindre du VEGF impliqué dans la néo-angiogenèse tumorale. Le cetuximab est indiqué dans le traitement de cancers colorectaux métastatiques et les cancers de la tête et du cou. Cependant cet anticorps a des limites puisqu'il peut entraîner chez certains patients des effets secondaires tels que des réactions d'hypersensibilité (Chung et al., 2008) ou l'acquisition de mécanismes de résistance au cetuximab (Brand et al., 2011). Le panitumumab (ABGX-EGF, Vectibix®), une IgG2 humain qui cible également l'EGFR et est utilisée dans le traitement du cancer du côlon. Récemment, la molécule Sym004, un mélange d'anticorps anti-EGFR, a montré son efficacité thérapeutique *in vivo* dans un modèle murin résistant au cetuximab (Iida et al., 2013).

Le trastuzumab (Herceptin®) est une IgG1 humanisée dirigée contre un épitope du domaine IV d'erbB2 (Cho et al., 2003) qui a la capacité de former des hétérodimères avec erbB3 et erbB4 pouvant lier ainsi l'héréguline, un facteur de croissance. Cependant la surexpression d'erbB2 peut entraîner la dimérisation spontanée des récepteurs chez les patientes atteintes de cancers du sein. Le pertuzumab (Perjeta®), un nouvel anti-erbB2 humanisé bloquant également la dimérisation des récepteurs membranaires par sa liaison au domaine II d'erbB2, a récemment obtenu l'AMM (2013) et est utilisé dans le traitement des cancers du sein métastatiques en association avec le trastuzumab.

D'autres anticorps agissent selon ce mode d'action comme le basiliximab (Simulect®) et le daclizumab (Zenapax®), deux IgG1, la première chimérique et la seconde humanisée, dirigées contre la chaîne α de l'IL-2R (CD25) inhibant ainsi la prolifération lymphocytaire T. Ces anticorps sont utilisés en prévention contre le rejet de greffe. Le tocilizumab (Roactemra®), une IgG1 humanisée dirigée contre la chaîne α de l'IL-6R. Il limite les phénomènes inflammatoires et est indiqué dans la polyarthrite rhumatoïde. L'abciximab (Reopro®), un fragment Fab d'IgG1, cible la chaîne β_3 des intégrines portée par le récepteur plaquettaire $\alpha_2\beta_3$ (GPIIb/IIIa) et le récepteur de la vitronectine $\alpha_v\beta_3$ exprimé par les plaquettes et les cellules endothéliales. Il inhibe de ce fait l'agrégation plaquettaire et est utilisé en prévention des complications ischémiques pouvant survenir après une angioplastie (Coller and Scudder, 1985).

Cytolyse par voie apoptotique : l'anticorps a la capacité d'induire la mort cellulaire par apoptose de la cellule portant l'antigène.

Le rituximab (Mabthera®), une IgG1 chimérique ciblant le CD20 une molécule transmembranaire exprimé par les lymphocytes B normaux et pathologiques, a montré la présence d'une lyse des cellules tumorales par apoptose après traitement des patients atteints d'une leucémie lymphoïde chronique (Byrd et al., 2002). Cependant, l'observation de ce phénomène est très variable selon les études (Smith, 2003). L'obinituzumab (GA101), le premier anticorps anti-CD20 de type II conçu par glyco-ingénierie dans le but d'induire une activité pro-apoptotique supérieure à celle du rituximab. Actuellement, cet anticorps est étudié en phase III en comparaison directe avec le rituximab dans le traitement de lymphome non hodgkinien et de lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL).

▪ Mécanismes dépendant de la portion Fc

La portion Fc des IgG est impliquée dans le recrutement de l'effecteur C1q induisant la cascade du complément et des cellules effectrices exprimant en surface les récepteur FcγR. Ces effecteurs de l'immunité possèdent leur mécanisme respectif: la cytotoxicité dépendante du complément (CDC, Figure 4C) et quand la cellule possède des propriétés cytotoxiques la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, Figure 4D) impliquées dans la pharmacodynamie des anticorps cytolytiques.

CDC (Complement Dependent Cytotoxicity)

Ce mécanisme fait intervenir la cascade du complément par la voie classique et peut physiologiquement être régulée négativement par des protéines (*CRP* : *Complement Regulatory Protein*). La surexpression de ces protéines CD46 (*MCP* : *membrane cofactor protein*), CD55 (*DAF* : *decay accelerating factor*) et CD59 (*HRF20* : *homologous restriction factor 20*) à la surface des cellules tumorales peut induire un mécanisme d'échappement anti-tumorale. L'anticorps recrute par son fragment Fc la protéine C1q du complément et active la cascade du complément aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire (*MAC* : *Membrane Attack Complex*) conduisant à la lyse de la cellule cible (pour revue Gelderman et al., 2004). La capacité de l'anticorps à fixer le C1q au niveau du domaine CH2 du fragment Fc et à activer la voie classique du complément dépend de multiples facteurs (Figure 5). La proximité de l'épitope antigénique reconnu et la membrane plasmique (Teeling et al., 2004), la densité de l'expression de l'antigène à la surface cellulaire ou encore l'affinité de l'anticorps pour sa cible (Teeling et al., 2006) favoriseraient le mécanisme de CDC.

L'alemtuzumab (Greenwood et al., 1993), le rituximab (Reff et al., 1994) et le trastuzumab (Sliwkowski et al., 1994) ont la capacité d'utiliser ce mécanisme d'action *in vitro*. Bien que des marqueurs d'activation du complément (produits de clivage du C3) aient été retrouvés chez l'homme après injection du rituximab (Bienvenu et al., 2001) aucune étude clinique n'a démontré à ce jour que le complément est impliqué dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutique. Toutefois, Di Gaetano et son équipe ont montré que des souris dont le gène codant C1q était invalidé (C1q^{-/-}) traitées par du rituximab ne contrôlaient pas le développement de tumeurs syngéniques humaines CD20⁺ montrant dans ce modèle murin l'implication du complément dans le mécanisme d'action du rituximab (Di Gaetano et al., 2003).

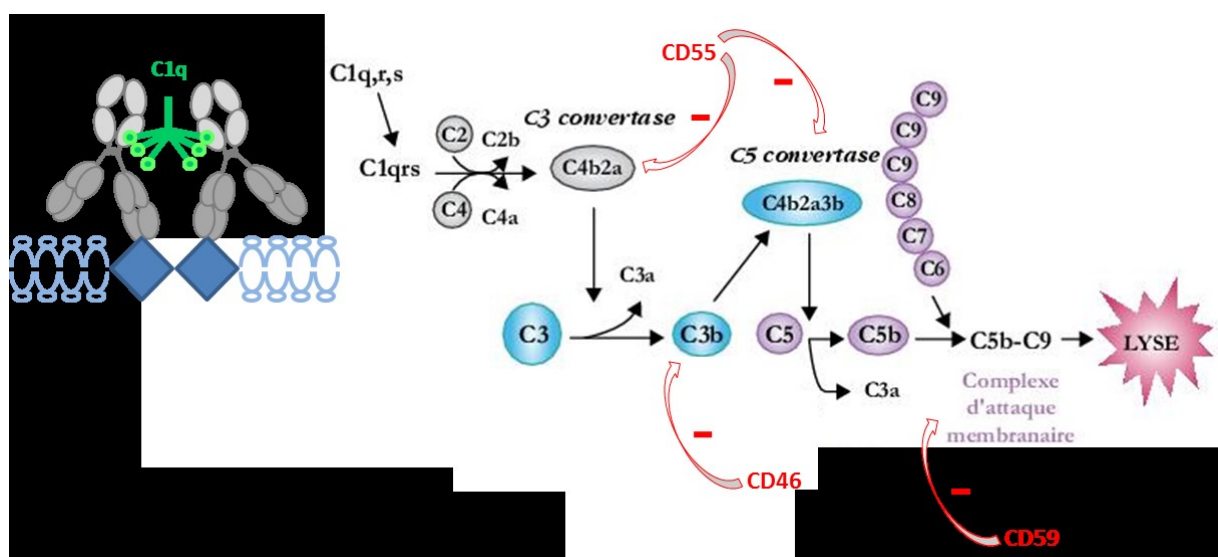


Figure 5 : Représentation schématique de la voie classique du complément. Le recrutement de l'effecteur C1q par la portion Fc de l'anticorps fixé à sa cible entraîne la cascade du complément par la voie classique. Le complément est physiologiquement régulé par des protéines régulatrices (en rouge) et aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire. (D'après Probst et al, 2006, bulletin du cancer).

ADCC (Antibody Dependant Cell mediated Cytotoxicity)

Ce mécanisme est initié par la fixation de l'anticorps sur sa cible antigénique par sa portion Fab qui permet le recrutement des cellules effectrices exprimant les FcγR et ayant un potentiel cytolytique comme les cellules « Natural Killer » (NK), les macrophages et les neutrophiles (pour revue Nimmerjahn and Ravetch, 2010). Les études *in vitro* ont montré que les cellules NK FcγRIIIA⁺ sont les principales cellules effectrices de l'ADCC induite par des anticorps thérapeutiques (Cooley et al., 1999; Manches et al., 2003; Dall'Ozzo et al., 2004). Il n'existe à ce jour aucun marqueur direct permettant de démontrer le rôle ou d'évaluer la part

de l'ADCC dans le mécanisme d'action des anticorps cytolytiques utilisés en oncologie tels que le rituximab (Cartron, 2002) et le trastuzumab (Beano et al., 2008). L'argument le plus fort en faveur du rôle de l'ADCC dans l'effet thérapeutique des anticorps cytolytiques reste indirect et provient de l'observation que le gène FCGR3A codant pour le FcγRIIIA présente un polymorphisme qui influence l'efficacité des anticorps monoclonaux thérapeutiques. La relation entre le génotype du FcγRIIIA et les réponses cliniques a été mise en évidence pour le rituximab chez les patients atteints de lymphome folliculaire non-Hodgkinien (Cartron, 2002; Weng and Levy, 2003), de Lupus Erythémateux disséminé (LED) (Anolik et al., 2003) ou encore de Macroglobulinémie de Waldenström (Treon et al., 2005). Cette association de la réponse clinique et de ce polymorphisme a également été observée pour l'infliximab dans la maladie de Crohn (Louis et al., 2004; Moroi et al., 2013) ; le trastuzumab dans le cancer du sein métastatique (Varchetta et al., 2007; Musolino et al., 2008) ainsi que le cétuximab dans le cancer colorectal métastatique, indépendamment de la mutation K-RAS (Bibeau et al., 2009; Calemme et al., 2012).

Toutefois, d'autres études cliniques ont montré des résultats divergents lorsque ces AcMo thérapeutiques sont associés à des chimiothérapies classiques (Mellor et al., 2013) indiquant que le polymorphisme du FcγRIIIA ne serait pas un marqueur prédictif de l'efficacité thérapeutique du trastuzumab chez les patients atteints d'un cancer du sein non métastatique HER2⁺ (Hurvitz et al., 2012), du rituximab chez les patients atteints de Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) (Ghesquière et al., 2012) et du cetuximab chez les patients avec un cancer colorectal avancé (Paez et al., 2010)

Tableau1 : Principaux bio-médicaments utilisés en France

DCI	Nom commercial	Isotype	Humanisation	Cellules productrices	Cible	Indications	AMM	Laboratoire titulaire
rituximab	Orthoclone OKT3	IgG2a	Murine	Hybridome	CD3	Rejet de greffe	1986	Johnson & Johnson
abatacept	Repro	Fab IgG1k	Chimérique	SP2/O	GP11b/IIa	Prévention complications ischémiques (angioplastie)	1995	Centocor - Lilly
rituximab	Mabthera	IgG1k	Chimérique	CHO	CD20	LNH, LLC, PR	1998	Genentech - Roche
basiliximab	Simulect	IgG1k	Chimérique	SP2/O	CD25	Prévention rejet de greffe rénale	1998	Novartis
palivizumab	Synagis	IgG1k	Humanisé	NS0	VRS	Prévention infections respiratoires dues au VRS	1999	Medimmune AstraZeneca
infliximab	Remicade	IgG1k	Chimérique	SP2/O	TNF α	PR, RCH, MC, Rh. psoriasique	1999	Schering Plough
trastuzumab	Herceptin	IgG1k	Humanisé	CHO	HER2	Cancer du sein métastatique, cancer du sein en situation adjuvante	2000	Genentech Roche
adalimumab	Humira	IgG1k	Humain	CHO	TNF α	PR, Rh. Psoriasique SPA, MC, Psoriasis	2003	Abbott
cetuximab	Erbix	IgG1k	Chimérique	SP2/O	EGFR	Cancer colorectal cancer tête et cou	2004	Merck-Serono
ibritumomab tiuxetan	Zevalin	IgG1k RIC	Murine	CHO	CD20	LNH	2004	Biogen-Idec
omalizumab	Xolair	IgG1k	Humanisé	CHO	IgE	Asthme allergique	2005	Genentech Novartis
bevacizumab	Avastin	IgG1k	Humanisé	CHO	VEGF	CCRM, Cancer bronchique, Cancer du rein, Cancer du sein métastatique	2005	Genentech Roche
natalizumab	Tysabri	IgG4k	Humanisé	NS0	Intégrine $\alpha4$	Sclérose en plaque	2006	Biogen-Idec Elan
ramlifumab	Lucentis	Fab IgG1k	Humanisé	E. Coli	VEGF	DMLA	2007	Genentech Novartis
panitumumab	Vectibix	IgG2k	Humain	CHO	EGFR	CCRM avec KRAS non muté	2007	Amgen
eculizumab	Soliris	IgG2/4k	Humanisé	NS0	C5	Hémoglobinurie paroxystique nocturne	2007	Alexion
certolizumab pegol	Cimzia	Fab'-PEG	Humanisé	E. Coli	TNF α	PR	2009	UCB Pharma
golimumab	Simponi	IgG1k	Humain	CHO	TNF α	PR, Rh. Psoriasique SPA	2009	Centocor Johnson & Johnson
canakinumab	Ilaris	IgG1k	Humain	SP2/O	IL-1 β	Syndrome de Muckle-Wells	2009	Novartis
catumaxomab	Removab	mIgG2a/IgG2b	Hybride Murin/Rat	Quadrome	EpCAM/CD3	Ascite maligne	2009	Trion - Fresenius
ustekinumab	Stelara	IgG1k	Humain	CHO	IL12/IL23	Psoriasis	2009	Centocor Johnson & Johnson
tocilizumab	Roactemra	IgG1k	Humanisé	CHO	IL-6R	PR	2009	Roche - Chugai
ofatumumab	Azera	IgG1k	Humain	CHO	CD20	LLC	2010	GSK / Genmab
denosumab	Prolia	IgG2k	Humain	CHO	RANK-L	Ostéoporose	2010	AMGEN
belimumab	Benlysta	IgG1A	Humain	NS0	BlyS	LES	2011	GSK
ipilimumab	Yervoy	IgG1k	Humain	CHO	CTLA-4	Mélanome	2011	BMS
brentuximab vedotin	Adcetris	IgG1k	Chimérique	CHO	CD30	Lymphome de Hodgkin	2012	Takeda
pertuzumab	Perjeta	IgG1k	Humanisé	CHO	HER2	Cancer du sein métastatique, cancer du sein en situation adjuvante	2013	Genentech Roche
alemtuzumab	Lemtrada	IgG1k	Humanisé	CHO	CD52	Sclérose en plaque	2013	Genzyme - Sanofi

DCI : Dénomination Commune Internatinalale ; AMM : Autorisation de Mise sur le Marché ; LNH : Lymphome Non Hodgkinien ; LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique ; PR : Polyarthrite Rhumatoïde ; MC : Maladie de Crohn, RHC : RectoColite Hémorragique ; Rh : Rhumatisme ; SPA : Spondylarthrite Ankylosante ; CCRM : Cancer ColoRectal Métastatique ; DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age ; LES : Lupus Érythémateux Disséminé.

II) Les cellules NK humaines

1) Généralités

En 1975, les travaux de Kiessling et Herberman ont permis d'identifier une nouvelle population de cellules lymphocytaires dont l'aspect microscopique est celle de grands lymphocytes granuleux (*LGL : Large Granular Lymphocyte*), avec un cytoplasme riche en granules lytiques. Ils ont observé que ces cellules avaient une activité cytotoxique naturelle (en absence d'une phase de sensibilisation) contre différentes cellules leucémiques (Kiessling et al., 1975a; b; Herberman et al., 1975a; b). Cette propriété, qui leur a valu l'appellation de lymphocytes « natural killer », leur permet de jouer un rôle crucial dans notre immunité innée et les distingue des lymphocytes T CD8 dont la cytotoxicité, par l'intermédiaire de leur récepteur (*TCR : T Cell Receptor*), est spécifique d'un épitope donné et nécessite une phase de différenciation. Comme décrit précédemment, les cellules opsonisées par les IgG peuvent être reconnues par les cellules NK, par l'intermédiaire du $Fc\gamma RIII A/CD16A$, induisant leur dégranulation et par conséquent la lyse de la cellule cible par le mécanisme d'ADCC. Outre leur cytotoxicité, les cellules NK ont la capacité de sécréter des cytokines, des facteurs de croissances et des chimiokines (Cooper, 2001; Fauriat et al., 2010b). Cette propriété immunorégulatrice donne également aux cellules NK un rôle dans la mise place de l'immunité spécifique de l'antigène qui intervient plus tardivement dans la réponse immunitaire. Les cellules NK sont ainsi considérées à l'interface entre le système immunitaire inné et adaptatif (Moretta, 2005; Vivier et al., 2011). Finalement, bien que les lymphocytes NK aient une aptitude à lyser spontanément les cellules tumorales ou infectées, ils sont paradoxalement également capable de tolérer les cellules saines dites « du soi ». Ce processus d'éducation des cellules NK se fait via des mécanismes de reconnaissance moléculaire impliquant ses récepteurs de surface (Anfossi et al., 2006; Andersson et al., 2009; Fauriat et al., 2010a; Béziat et al., 2013) (cf *infra*).

2) Profil phénotypique, localisation et maturation

Les cellules NK dérivent d'un progéniteur hématopoïétique $CD34^+$ commun aux lymphocytes T et B de la moelle osseuse mais n'expriment cependant ni le récepteur spécifique de l'antigène des lymphocytes T ($TCR/CD3$) ni l'immunoglobuline membranaire des lymphocytes B (BCR) obtenus par réarrangement de l'ADN. Bien que les cellules NK

aient été récemment classé comme les cellules lymphoïdes innées du groupe 1 (Spits and Di Santo, 2011), sur le plan phénotypique elles sont classiquement caractérisées chez l'Homme par l'absence du CD3 et la présence du CD56 (Robertson and Ritz, 1990). Le niveau d'expression du cluster de différenciation CD56 ou NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) permet d'identifier chez l'Homme deux sous-populations de cellules NK dont les propriétés phénotypiques et fonctionnelles sont distinctes: CD56^{dim} et CD56^{bright} (Cooper et al., 2001; Poli et al., 2009). Ces deux sous-types de cellules NK peuvent elle-même se diviser en cinq populations définies en fonction de leur degré d'expression en CD16 : CD56^{bright}CD16⁻, CD56^{bright}CD16^{dim}, CD56^{dim}CD16⁻, CD56^{dim}CD16⁺ et CD56⁻CD16⁻ (Nagler et al., 1989) (Figure 6).

Le développement des cellules NK est initié dans le foie fœtal et se poursuit dans la moelle osseuse. Après maturation et différenciation, elles migrent vers le sang périphérique où elles représentent 5 à 15% des cellules lymphoïdes totales. Leur renouvellement sanguin s'effectue en deux semaines. Elles sont également détectées dans les organes lymphoïdes (rate, amygdales, ganglions périphériques) et dans certains tissus (foie, poumon et placenta) (Di Santo and Vosshenrich, 2006). Les NK CD56^{dim} représentent la population majeure des cellules NK du sang périphérique à raison de 90 à 95% (Lanier et al., 1986). Elles expriment fortement le FcγRIIIA/CD16A au niveau membranaire et possèdent de nombreuses granules cytoplasmiques contenant des protéases à potentiel pro-apoptotique. Elles expriment également des récepteurs à chimiokine tel que CXCR1 et CX3CR1 impliquées dans le recrutement des cellules NK sur les sites d'inflammation (Parolini et al., 2007). A l'inverse, les cellules NK CD56^{bright} sont retrouvées en majorité dans les tissus lymphoïdes tels que les amygdales et ganglions lymphatiques (Ferlazzo et al., 2004). Elles expriment peu ou pas le FcγRIIIA/CD16A et la perforine. L'expression membranaire de la chimiokine CCR7 et de la L-sélectine (CD62-L) permet respectivement la domiciliation (Kim et al., 1999) et l'entrée des cellules NK CD56^{bright} dans les ganglions lymphatiques (Chen et al., 2005). De nombreuses études suggèrent que les cellules NK CD56^{bright} pourraient être les précurseurs des cellules NK CD56^{dim}. Un modèle de développement des cellules NK humaines in vivo composé de cinq stade a été proposé : Les pro-NK (stade 1), les pré-NK (stade 2), les cellules NK immatures (stade 3), les cellules NK CD56^{bright} (stade 4) et la maturation des cellules NK CD56^{bright} versus CD56^{dim} (stade 5) (Freud and Caligiuri, 2006).

Il a longtemps été admis que la fonction effectrice majeure des cellules NK CD56^{dim} était la cytotoxicité, tandis que les cellules NK CD56^{bright} agissaient principalement par la sécrétion de

cytokines comme l'IFN- γ (Cooper et al., 2001a) (Figure 6). Cependant, différentes études ont montré que la plupart des cellules NK qui produisent de l'IFN- γ en réponse à une stimulation par des cellules K562 (les cibles cellulaires habituellement utilisées dans les tests de cytotoxicité naturelle), des cellules cibles opsonisées par des Ac (Anfossi et al., 2006), des cellules de *Drosophila* exprimant des ligands pour les récepteurs activateurs des cellules NK (Fauriat et al., 2010b) ou des globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum* (Korbel et al., 2005) appartiennent à la sous-population CD56^{dim}. D'autre part, les cellules NK qui répondent facilement à une stimulation par des monokines telles que l'IL-12 ou IL-15 sont les cellules NK CD56^{bright} (Cooper et al., 2001; Anfossi et al., 2006). Il semblait alors plus approprié de définir des cellules NK CD56^{dim} et CD56^{bright} respectivement comme les cellules « répondeuses aux cibles/interactions membranaires » et les « cellules « répondeuses aux cytokines » (Anfossi et al., 2006). Cependant, cette distinction ne semble pas être absolue. En effet, il a récemment été rapporté que les cellules CD56^{dim}CD62L⁺ sont capables de répondre aussi bien aux cibles qu'aux cytokines (Juelke et al., 2010). De plus, le développement et la diversité des cellules NK semble dépendre de plusieurs autres processus complexes impliquant des interactions protéiques dont l'acquisition de la tolérance du soi et des fonctions effectrices.

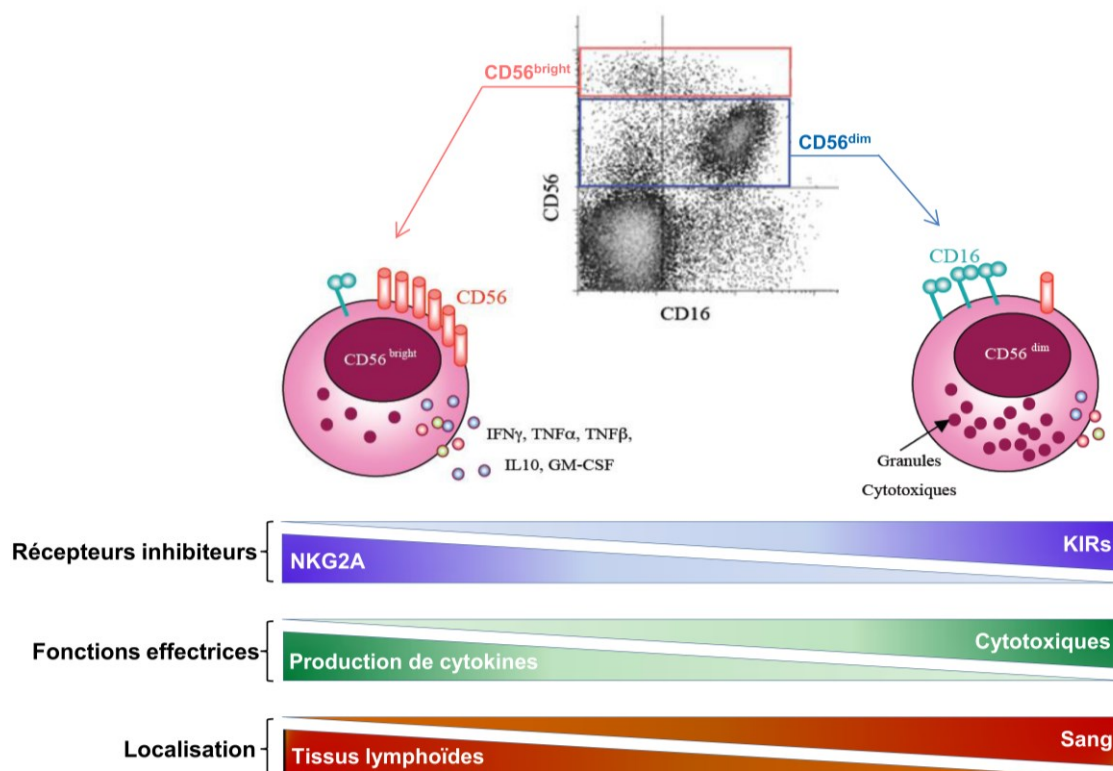


Figure 6 : Comparaison du profil des cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} en terme d'expression phénotypique des protéines de surface, des fonctions effectrices et de la localisation dans l'organisme. L'analyse par cytométrie en flux permet de déterminer, parmi les cellules NK CD56^{dim} et CD56^{bright} (d'après Cooper et al., 2001), cinq sous-populations en fonction du niveau d'expression du CD56 et du CD16: CD56^{bright}CD16⁻, CD56^{bright}CD16^{dim}, CD56^{dim}CD16⁻, CD56^{dim}CD16⁺ et CD56⁻CD16⁻ (Nagler et al., 1989).

3) Fonctions effectrices des cellules NK

Les cellules NK sont, comme décrit précédemment, connues pour leur fort pouvoir cytotoxique au cours de la réponse immunitaire innée. Cependant, elles interviennent également indirectement dans la réponse immunitaire adaptative par leur capacité de production de diverses cytokines et d'interaction avec les cellules effectrices présentatrices d'antigènes.

a) Mécanisme de cytotoxicité

▪ L'exocytose des granules lytiques

Les cellules NK ont la capacité de distinguer les cellules du soi stressées (par exemple par une infection virale ou par un processus de transformation tumoral) des cellules non stressées. Elles sont également capables d'identifier les cellules cibles opsonisées par des anticorps spécifiques, par la reconnaissance de l'IgG via le FcγRIIIA/CD16A. La formation de conjugués effecteur-cible et de synapses immunologiques, qui en découle, induit le processus de dégranulation des cellules NK et entraîne la mort des cellules cibles. Toutefois, bien que le mode de reconnaissance de la cellule cible diffère dans la cytotoxicité naturelle et l'ADCC, le mécanisme de cytotoxicité des cellules NK qui en découle est identique. Il est initié par l'orientation de l'appareil de golgi, du cytosquelette d'actine, des microtubules et des granules lytiques de la cellule NK au niveau des radeaux lipidiques de la zone de contact avec la cellule cible (Kupfer et al., 1983) . Il est à noter que la protéine LFA-1 joue un rôle central dans le relargage de l'arsenal cytotoxique puisque sa liaison à ICAM présent à la surface de la cellule cible entraîne non seulement l'adhésion cellulaire (Bryceson et al., 2005, 2009) mais également la polarisation du contenu des granules lysosomiaux, constitués de protéases à potentiels pro-apoptotiques tels que la perforine et les granzymes, vers la cellule cible (Gross et al., 2010). Dans un premier temps, les molécules de perforine se polymérisent en présence de calcium permettant la création de pores cylindriques dans la membrane de la cellule cible.

Survient alors l'entrée des diverses sérines protéases (les granzymes A, B, H, K et M) et la granulysine qui vont altérer la cohésion membranaire et déclencher la voie apoptotique par l'activation notamment des pro-caspases. Les granules expriment également au niveau membranaire des glycoprotéines fortement N-glycosylées de la famille des LAMP (Lysosome Associated Membrane Protein) dont LAMP-1 (CD107a), une protéine également indispensable dans le mécanisme de cytotoxicité des cellules NK (Krzewski et al., 2013). Au cours du processus de dégranulation, ces protéines se retrouvent redistribuées au niveau de la membrane de la cellule NK (Alter et al., 2004). L'expression membranaire de cette protéine peut alors être détectée et utilisée comme un marqueur témoin de l'activité cytotoxique de la cellule NK (Figure 7).

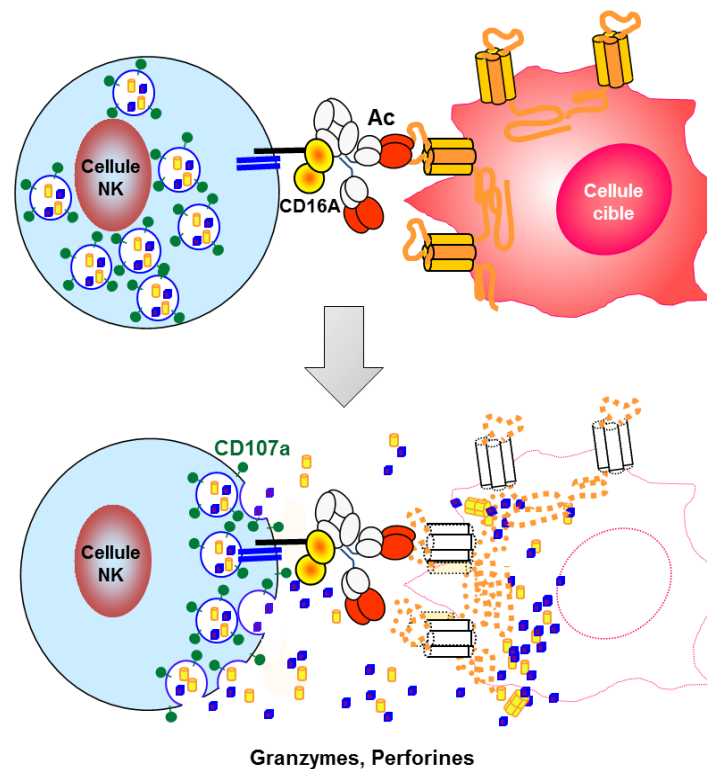


Figure 7: Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps (ADCC). Le FcγRIIIA/CD16A exprimé à la surface des cellules NK va par la reconnaissance de la portion Fc de l'Ac fixé sur la cible permettre la formation de conjugués effecteur/cible et ainsi activer la cellule NK. Cette dernière possède des granules qui vont se polariser au niveau de la membrane cellulaire et déverser leur contenu cytolytique constitué de protéases à potentiel pro-apoptotiques comme la perforine et les granzymes entraînant la lyse de la cellule cible. Les glycoprotéines telles que le CD107a exprimées à la surface des granules sont redistribuées à la surface membranaire de la cellule NK lors du processus de dégranulation.

▪ Les récepteurs de mort cellulaire

Les cellules NK ont la possibilité d'utiliser des mécanismes alternatifs pour induire la mort de la cellule cible. Elles sécrètent notamment le TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire, et expriment des protéines membranaires telles que les TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et Fas-L (FAS-Ligand) qui vont reconnaître leurs récepteurs respectifs, TNFR (CD120), TRAIL-R et Fas (CD95), exprimés par les cellules cibles. Ces récepteurs font partie de la super famille des récepteurs aux TNF possédant dans leur partie intracytoplasmique des domaines de mort (DD : *Death Domain*). Par exemple la fixation du ligand Fas-L à son récepteur conduit à la trimérisation du récepteur Fas et au recrutement des protéines FADD (Fas-Associated Death Domain). Ces dernières vont alors pouvoir recruter la pro-caspase 8 qui après auto-protéolyse s'active. L'assemblage des différents médiateurs résulte en la formation du complexe DISC (Death-Inducing Signalling Complex) qui permet le recrutement d'autres caspases telle que la caspase 3. Cette cascade enzymatique aboutit à la mort de la cellule cible par apoptose (pour revue Chávez-Galán et al., 2009).

b) Production et sécrétion de chimiokines et de cytokines

Les cellules NK CD56^{bright} sont la principale source de cytokines induites par les monokines. Cependant, la majorité des cellules NK circulantes est représentée par les cellules NKCD56^{dim}. Bien que ces dernières soient essentiellement caractérisées par leurs propriétés cytotoxiques, elles ont également la capacité de produire de nombreuses cytokines pro-inflammatoires en réponse aux cellules cibles comme l'IFN- γ et le TNF- α ou des cytokines immunosuppressives telles que L'IL-10 et le TGF- β (Transforming Growth Factor) (Cooper et al., 2001; Anfossi et al., 2006; Fauriat et al., 2010b). L'IFN- γ , produit en grande quantité par les cellules NKCD56^{dim}, joue un rôle primordial dans l'immunité anti-virale et anti-tumorale. Il influence aussi bien la réponse immunitaire innée, en promouvant la phagocytose par les macrophages et la maturation des cellules dendritiques, que la réponse immunitaire adaptative en favorisant l'orientation des lymphocytes CD4⁺ vers la voie Th1 (Martín-Fontecha et al., 2004). Les NKCD56^{dim} sécrètent également des facteurs de croissance tels que le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor) et diverses chimiokines dont MIP1- α (*Macrophage Inflammatory Protein 1- α* ou CCL3), MIP1 β (CCL4) et RANTES (CCL5) (Fauriat et al., 2010b). Cette propriété immunorégulatrice permet aux cellules NK d'exercer une fonction de coopération cellulaire par le recrutement et l'activation des macrophages, des cellules

dendritiques et des neutrophiles (Moretta, 2005; Vivier et al., 2011) et d'intervenir dans la polarisation d'une réponse immunitaire acquise efficace (Figure 8).

Bien que les cytokines produites par les cellules NK soient nombreuses et diverses, elles dépendent de la stimulation initiale. En effet, les récepteurs aux cytokines et aux chimiokines que les cellules NK expriment sont essentiels à leur différenciation, prolifération, migration et également à leur activation (notamment les récepteurs à L'IL2, IL15, IL-12, IL-18) (Carson et al., 1997; Tomescu et al., 2009). Elles interviennent dans le « priming » des cellules NK nécessaire à leur potentiel effecteur. L'IL-2 favorise l'expansion clonale et permet aussi l'augmentation de la cytotoxicité (Caligiuri et al., 1990). L'IL-15 joue un rôle crucial dans la différenciation des progéniteurs CD34⁺ en cellules NK, favorise l'homéostasie des cellules NK (Ranson et al., 2003) et les protège de l'apoptose grâce au contrôle de l'expression du facteur lymphocytaire anti-apoptotique Bcl-2 (Cooper et al., 2002). De plus, son activité est améliorée lorsqu'elle est trans-présentée par son récepteur, l'IL-15R α , présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques (Huntington et al., 2009) (Figure 8). Ainsi, l'engagement des récepteurs de ces interleukines permet la pré-activation directe des cellules NK par leur interaction avec certaines cellules du système immunitaire ou indirect par les cytokines solubles produites (Fehniger and Caligiuri, 2001; Cooper et al., 2002).

Le processus de « priming » des cellules NK permet la réactivité des cellules NK et contribuent ainsi à l'intensité et à la qualité des fonctions effectrices des cellules NK activées (Agaugué et al., 2008). L'interleukine 2 (IL-2) ou la combinaison des interleukines IL-12+IL-18 favorise la production d'IFN- γ , la combinaison d'IL-12 et d'IL-15 la production du GM-CSF ou encore la combinaison d'IL12 et d'IL15 l'induction d'un fort niveau d'IL-10. Romee et son équipe ont récemment montré que la pré-activation in vitro à court terme des cellules NK humaines par une combinaison d'IL12 + IL18 induisait une propriété de « cellules mémoire induite par les cytokines » permettant une augmentation significative de la production d'IFN- γ (Romme et al, 2013) confirmant également les résultats précédemment obtenu pour les cellules NK murines (Cooper et al., 2009). Toutefois, l'acquisition des capacités effectrices et l'intensité de la réponse des cellules NK ne reposent pas uniquement sur la présence des facteurs sécrétés mais également sur l'intégration d'une multitude de signaux transmis par leurs récepteurs de surface.

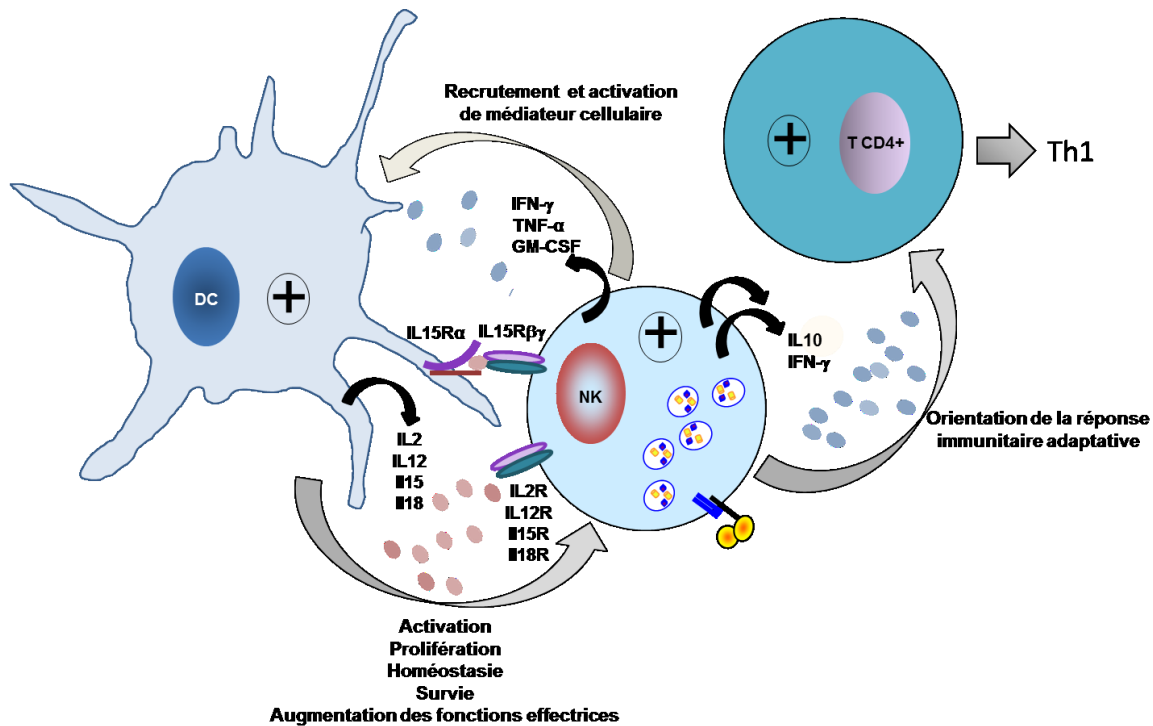


Figure 8 : Propriété immunorégulatrice et «mémoire médiée par les cytokines» des cellules NK. Par la production de diverses cytokines, les cellules NK sont capables d'interagir avec les cellules dendritiques et de polariser la réponse immunitaire adaptative. Les cytokines produites par les cellules NK dépendent de la stimulation monokinique initiale qui interviennent dans la pré-activation des cellules NK.

4) Mécanisme de reconnaissance de la cellule cible et activation de la cellule NK.

Une fine balance de signaux provenant des récepteurs inhibiteurs et activateurs exprimés à la surface des cellules NK est maintenue en association avec l'état d'activation des cellules NK (Vivier et al., 2004) (Figure 9). A l'inverse des lymphocytes T et B qui possèdent un récepteur activateur majeur (TCR et BCR, respectivement), les cellules NK n'expriment pas de récepteur spécifique à l'antigène mais un large éventail de récepteurs activateurs (Figure 10, panel de droite) dont le co-engagement est nécessaire pour entraîner l'activation cellulaire. Ainsi, l'intensité du signal d'activation dépend du nombre de récepteurs activateurs engagés (Fauriat et al., 2010b). De plus, les réponses fonctionnelles sont acquises de manière séquentielle par la cellule NK de ce fait, l'augmentation de récepteurs activateurs engagés est nécessaire pour que de nouvelles fonctions effectrices s'exercent. Le FcγRIIIA/CD16A fait figure d'exception puisqu'il est capable d'induire, par son seul engagement, à la fois la

production de cytokines et le déclenchement de la cytotoxicité (Bryceson et al., 2005). D'autre part, les récepteurs inhibiteurs (Figure 10, panel de gauche) permettent le contrôle de cette activation par la reconnaissance des molécules du CMH-I exprimées constitutivement par les tissus sains (Figure 9, à droite). Les cellules NK peuvent ainsi discriminer les cellules du soi et du non-soi ou du soi altéré telles que les cellules infectées ou stressées qui n'expriment peu, voire pas, les molécules du CMH-I et expriment différents ligands de stress (Figure 9, à gauche).

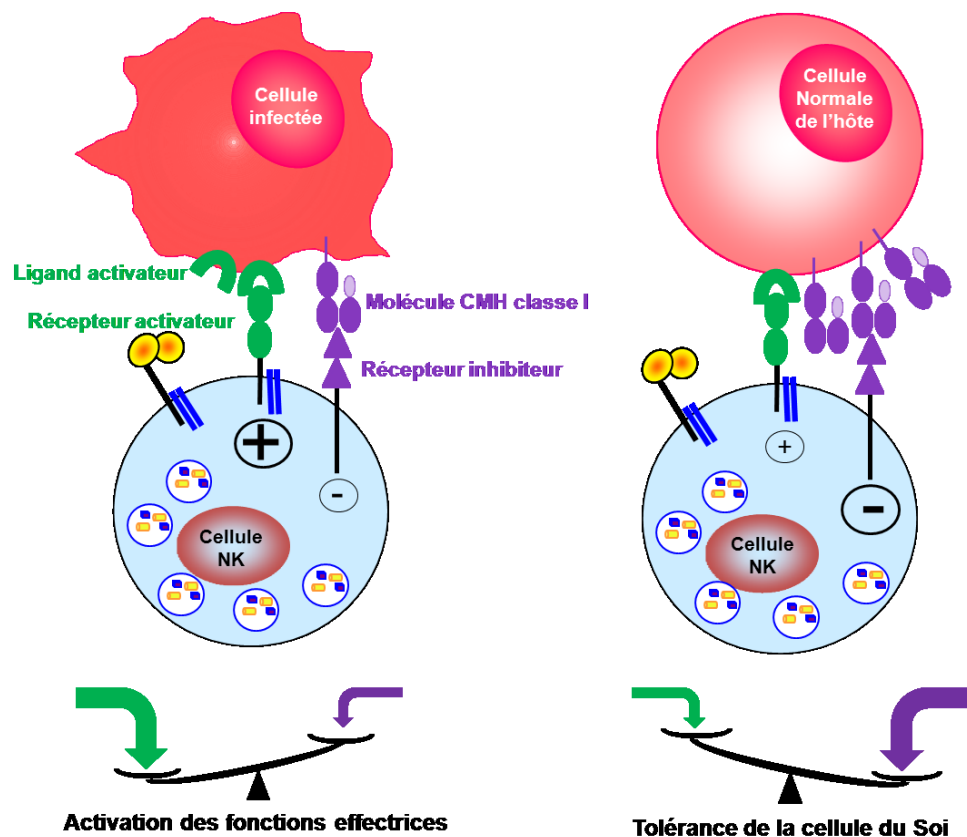


Figure 9 : Mécanisme de reconnaissance de la cible par les cellules NK. L'état d'activation des cellules NK résulte d'une balance de signaux provenant des récepteurs activateurs et inhibiteurs présents en surface. Ainsi l'intégration d'un signal activateur plus fort que le signal inhibiteur entrainera une activation de la cellule NK et donc une réponse fonctionnelle tandis qu'un signal inhibiteur plus fort que le signal activateur entrainera une inhibition de la cellule NK et donc la tolérance de la cellule cible.

a) Les récepteurs inhibiteurs

Les cellules NK comptent 3 grandes familles des récepteurs inhibiteurs qui ont pour ligands les molécules classiques et non-classiques de CMH-I : les KIR_L et les LILR (Leucocyte Immunoglobulin Like Receptor), deux familles de glycoprotéine de type I, et les

récepteurs hétérodimérique CD94/NKG2 de la famille des glycoprotéines de type II. Chez l'homme, les protéines du CMH-I classiques sont codés par les différents allèles A, B et C du locus HLA (Human Leucocyte antigen) et les molécules non classiques par HLA-E et HLA-G. Tandis que parmi les ligands indépendants des molécules du CMH-I, on distingue le CD48, les ligands liés aux récepteurs apparentés aux lectines de type C, les acides sialiques, les molécules d'adhésion et de jonction cellulaire tel que le KLRG1 qui lie au niveau des jonctions inter-cellulaires des molécules de la famille des cadhérines, perdues par les cellules épithéliales tumorales (Ito et al., 2006). Les récepteurs inhibiteurs sont impliqués dans l'éducation et l'activation des cellules NK (Anfossi et al., 2006; Juelke et al., 2009; Fauriat et al., 2010a). Toutefois il existe une grande hétérogénéité d'expression des récepteurs inhibiteurs dû à l'importante diversité combinatoire possible (Gardiner, 2008). La variabilité d'expression observée est inter- et intra-individuelle. D'une part, l'expression des récepteurs KIR est restreinte aux cellules CD56^{dim} tandis que le récepteur NKG2A/CD94 de la famille des lectines de type C est fortement exprimé à la surface des cellules CD56^{bright} et de manière variable sur les cellules CD56^{dim}. De plus, d'un individu à l'autre les proportions de cellules NK exprimant un récepteur inhibiteur particulier est très variable. Tandis que chez un individu donné, cette variabilité d'expression se traduit par la présence d'aucun à plusieurs récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules NK (Yawata et al., 2006; Yu et al., 2007; Yawata et al., 2008). En outre, cette variation d'expression peut avoir des conséquences fonctionnelles puisqu'une cellule NK qui ne possède pas de récepteurs inhibiteurs ne pourra pas exercer de réponse fonctionnelle, à l'inverse, la présence de plusieurs récepteurs inhibiteurs augmente leurs capacités fonctionnelles (Joncker et al., 2009).

Ces récepteurs possèdent au niveau intracytoplasmique un motif de signalisation cellulaire commun, le motif ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), défini par le motif (I/L/V/S)xYxx(L/V) (Daëron et al., 1995). La reconnaissance du ligand par son récepteur induit l'engagement de ce dernier qui se traduit par la phosphorylation de la Tyrosine (Y) par les kinases de la famille des Src qui peuvent alors recruter les phosphatases ship-1 : SHP1 et SHP2 (SHP : Src-Homology 2-containing Inositol 5'Phosphatase). Ces phosphatases peuvent ainsi contrôler l'activation cellulaire en déphosphorylant les protéines impliquées dans la cascade de signalisation « activatrice » (Abeyweera et al., 2011)

▪ Les récepteurs KIR (Killer Immunoglobuline-like Receptor)

Ces récepteurs KIR sont présents uniquement chez l'Homme et sont codés par un ensemble de gènes polymorphes localisés en 19q13.4 au niveau du cluster des récepteurs leucocytaires (LCR : Leucocyte Receptor Complex). Ce locus est soumis à une variation génétique importante à la fois dans le nombre de gènes présents et dans la séquence de chaque allèle KIR (Parham, 2005a; Campbell and Purdy, 2011). Le polymorphisme des récepteurs KIR influence donc le répertoire des cellules NK humaines conduisant à une grande diversité de cellules NK présent chez chaque individus (Fauriat et al., 2008; Andersson et al., 2009; Schönberg et al., 2011). En fonction du nombre de domaines extracellulaires Ig-like, les KIR_L peuvent être divisés en deux types de récepteurs: les KIR3D contiennent 3 domaines Ig-like et la structure KIR2D n'en contient que 2. Ils reconnaissent les molécules HLA-A, B et C : le CD158a (KIR2DL1) reconnaît les molécules HLA-C avec une N⁷⁷ et K⁸⁰ (motif HLA-C2); le CD158b (KIR2DL2/3) reconnaît les molécules HLA-C avec une S⁷⁷ et N⁸⁰ (motif HLA-C1) (Colonna et al., 1993); le CD158e reconnaît les molécules HLA-Bw4 et certaine protéine HLA-A possédant le motif épitopique Bw4 (Gumperz et al., 1997). Outre le nombre de domaines Ig-like extracellulaires variables, les KIR_L possèdent un long domaine intra-cytoplasmique pouvant se distinguer par le nombre de motifs ITIM. À titre d'exemple, la protéine CD300a/IRp60 qui est un récepteur possédant un domaine extracellulaire de type Ig et avec 3 motifs ITIM dans sa région intra-cytoplasmique. Cependant son ligand est encore inconnu (Cantoni et al., 1999).

▪ Les récepteurs de la famille des lectines de type C

Ces récepteurs sont exprimés à la surface des cellules NK sous forme d'hétérodimères CD94/NKG2 (Lazetic et al., 1996). Les protéines transmembranaires de type II qui les constituent sont codées par les gènes présents en 12q12.3-p13.3 (CD94, NKG2-A, -C, -E). La molécule CD94 est une molécule invariante dépourvue de domaine intra-cytoplasmique et de ce fait sans capacité de transduction du signal. De plus, le gène codant pour la protéine CD94 ne présente pas ou peu de polymorphisme allélique. Toutefois, le CD94 forme un récepteur inhibiteur par sa liaison au NKG2-A (CD159A) ou NKG2-B (un variant de NKG2A) (Kaiser et al., 2008), qui sont codés par un gène de la famille du NKG2 et possède un motif ITIM (Kabat et al., 2002). Le récepteur inhibiteur ainsi formé a pour ligand les molécules non conventionnelles de type HLA-E (Miller et al., 2003) qui fixent et présentent des peptides dérivés des molécules du CMH-I classiques HLA-A, B ou C. Les molécules HLA-E sont

donc exprimées à conditions que la cellule NK possède les autres molécules du CMH-I. Ainsi, l'expression de HLA-E reflète le niveau d'expression des molécules CMH de classe I classiques. Le récepteur CD94/NKG2A a la particularité de lier son ligand avec une affinité plus forte que son homologue activateur CD94/NKG2C (Valés-Gómez et al., 1999). Il a également la capacité de reconnaître les molécules HLA-E présentant le peptide signal des molécules de stress de type HSP60. L'absence de liaison du récepteur au ligand rend alors les cellules exprimant ce type de molécule plus sensible à la lyse des cellules NK (Michaëlsson et al., 2002).

- **Les récepteurs de la famille LILR (ILT/LIR-CD85j : Immunoglobulin like transcripts/Leucocyte Ig like Receptor)**

Ces récepteurs sont localisés en 19q13.4. Sur les 13 gènes les codant, un seul est un récepteur inhibiteur exprimé par les cellules NK : LILRB1 (ILT2/LIR1-CD85j) (Cosman et al., 1997; Colonna et al., 1999). Le CD85j est une glycoprotéine possédant 4 domaines Ig extra-cellulaire et 4 motifs ITIM intra-cytoplasmique. Il est exprimé par les cellules dendritiques, les monocytes et les lymphocytes B de manière constante, ainsi que de manière variable par un faible pourcentage des lymphocytes T (4-20%) et les cellules NK (23-77%) (Saverino et al., 2000). Il reconnaît une région très conservée des molécules classiques et non-classiques de classe I HLA-A, -B, -C, -E, -F et -G (Navarro et al., 1999). Concernant les molécules HLA-non-classique, l'interaction du CD85j au HLA-G exprimé sur le trophoblaste pourrait inhiber les leucocytes de la décidua, contribuant ainsi à la tolérance materno-fœtale (Hunt et al., 2005). Le CD85j est également capable de se lier à l'IUL-18, une protéine virale du cytomégalo virus humain (HCMV) similaire structuralement avec les molécules de classe I du CMH (Occhino et al., 2008). Cette interaction est notamment un mécanisme d'échappement du virus à la lyse des cellules NK (Kim et al., 2004). Une récente étude a permis d'identifier un nouveau ligand du CD85j : une protéine de la famille S100 nommée S100A9 qui intervient dans l'activité antivirale des cellules NK vis-à-vis des cellules dendritiques infectées par le VIH-1 (Arnold et al., 2013).

- **Les récepteurs de la famille des Siglec (Sialic acids binding Ig-like lectins)**

Cette famille de récepteurs tel que le Siglec 7/p75/AIRM1, dont le gène est localisé en 19q13.3, reconnaît les acides sialiques, des ligands indépendants des CMH-I (Kumar and McNerney, 2005). Le Siglec 7 est exprimé par les cellules NK et reconnaît un motif sialylé présent sur le ganglioside GD3 présent en grand quantité à la surface des cellules de

mélanome (Nicoll et al., 2003). Cette interaction pourrait constituer un mécanisme d'échappement des cellules tumorales à la lyse naturelle des cellules NK (Hudak et al., 2014). De la même manière, le récepteur CEACAM1 (Carcinoembryonic Antigen(CEA)-related Cell Adhesion Molecule) exprimé par certaines cellules tumorales (Markel et al., 2002) possède un motif ITIM permettant d'inhiber les fonctions effectrices des cellules NK par l'interaction avec son ligand (Hosomi et al., 2013).

b) Les récepteurs activateurs

Les cellules NK expriment une batterie de récepteurs activateurs dont les récepteurs de la famille des immunoglobulines de type KIR, des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) et ceux apparentés aux lectines de type C (Figure 10). Ces récepteurs vont se lier à des glycoprotéines transmembranaires de type I : associées en homodimères pour DAP12 et en hétérodimères pour le FcεRI-γ et le CD247 (ou CD3 zeta/CD3ζ). Cette dimérisation se fait par le biais de leur courte région extracellulaire riche en cystéines. Leur partie intracytoplasmique est composée d'un ou plusieurs motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) définis par le motif (D/E)xxYxx(L/I)_{x6-8}Yxx(L/I). Les molécules DAP12 et FcεRI-γ possèdent un seul motif tandis que le CD147 en exprime trois.

L'engagement du récepteur va se traduire par la phosphorylation des Y des motifs ITAM par des kinases de la famille des Src (Lck, Fyn, Yes, Lyn) permettant ainsi le recrutement des tyrosines kinases Syk et ZAP-70 par leur domaine SH2. Ces dernières vont alors mobiliser des adaptateurs nécessaires à l'ancrage des molécules de transduction de signal cellulaire tels que LAT (Linker of Activated T cell), SLP-76 (SH2 containing Leucocyte Phosphoprotein of 76 KDa) et 3BP2 (SH3-binding protein 2) (Vivier et al., 2004). Les voies de signalisation principales sont au nombre de deux. La première dépend de la Phospholipase Cγ (PLCγ) qui va permettre la production d'IP3 (inositol triphosphate) et de DAG (diacyl glycerol) à partir du PIP2 (phosphatidy inositol diphosphate) membranaire. L'ensemble de ces médiateurs va entraîner une augmentation de calcium (Ca²⁺) intracellulaire et une translocation de facteurs de transcription tels que NFAT et NFκB au niveau du noyau pour l'activation de la cellule NK (MacFarlane and Campbell, 2006). La seconde dépendante de la PI3Kinase (PI3K) va aboutir à l'activation des molécules Akt intervenant dans le maintien de la survie cellulaire (Vivier et al., 2004), à la synthèse de PIP3. La molécule PIP3 induit l'activation de la voie PLCγ et des protéines Vav, des facteurs nucléotidiques d'échange impliqués dans l'activation des GTPases telles que Rac intervenant dans la modulation de la plasticité du cytosquelette,

de l'adhésion, de la cytotoxicité et de la régulation transcriptionnelle (MacFarlane and Campbell, 2006). L'activation ultérieure par Rac des MAP Kinases (Mitogen Associated Protein Kinase) joue un rôle crucial dans la mise en place des fonctions effectrices des cellules NK (Mainiero et al., 1998). Toutefois, la voie des MAP Kinase peut également être activée par l'intermédiaire d'un complexe d'échangeur nucléotidique Grb2/SOS (Son Of Sevenless) (MacFarlane and Campbell, 2006). Il résulte de cette signalisation « activatrice » la réorganisation du cytosquelette, la dégranulation ainsi que la production de cytokines (Vivier et al., 2004; Yokoyama, 2008). De plus, le nombre de récepteurs activateurs engagés est associé à l'intensité des réponses fonctionnelles des cellules NK (Fauriat et al., 2010b)

▪ Les récepteurs de la superfamille des Immunoglobulines

Les récepteurs KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor)

Ces récepteurs sont comme leurs homologues inhibiteurs constitués de 2 (KIR2D) ou 3 (KIR3D) domaines immunoglobuliniques extracellulaire mais avec un court domaine intracytoplasmique (KIRS) et reconnaissent les molécules du CMH-I. La molécule est associée par l'intermédiaire d'une Lysine (K) située dans la partie transmembranaire avec la chaîne transductrice DAP12 sous forme d'hétérodimères incluant un motif ITAM (Lanier, 2005). Toutefois, le récepteur activateur KIR2DL4 (CD158d) fait figure d'exception puisqu'il possède une longue queue intra-cytoplasmique avec un motif ITIM associée, par l'intermédiaire d'une arginine (R) dans sa région transmembranaire, à une chaîne transductrice FcεRI-γ aux motifs ITAM (Lanier, 2005). Ce récepteur peut ainsi induire les fonctions activatrices des cellules NK.

Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)

Ces récepteurs sont principalement impliqués dans la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales et/ou infectées par des virus (Moretta et al., 2001). Ils appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et comprend les protéines NKp46 (CD335), NKp44 (CD336) et NKp30 (CD337). Ils sont constitué d'un (NKp30 et NKp44) ou deux (NKp46) domaines extracellulaires, une région transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. La transmission du signal positif nécessaire à l'activation cellulaire se fait par la chaîne transductrice CD247 (CD3ζ) et FcεRI-γ contenant un motif ITAM auquel ils sont associés via un acide aminé chargé (une lysine (K) ou un acide aspartique (D)) contenu dans leur région transmembranaire. Ces récepteurs jouent un rôle de coopération ou de synergie dans la

cytotoxicité des cellules NK et ont une densité d'expression interindividuelle très variable (Bryceson et al., 2006).

NKp46 : Il s'agit du premier membre de la famille à avoir été identifié (Sivori et al, 1997). Le gène codant le récepteur NKp46 est situé en 19q13.4. Cette glycoprotéine de 46 kDa très conservée entre les espèces de mammifères (Pessino et al., 1998) est caractérisé par deux domaines extracellulaires de type Ig, d'une région transmembranaire contenant une arginine (R) impliquée dans la stabilisation des interactions avec les molécules transductrices associées FcεRI-γ et CD3ζ sous forme d'homo- ou hétérodimères reliés par des ponts disulfures. Le NKp46 reconnaît les hémagglutinines du virus influenza et les neuraminidases du virus de Sendai (Mandelboim et al., 2001). L'interaction du NKp44/NKp46 et des hémagglutinines du virus grippe joue un rôle crucial dans l'élimination des cellules infectées (Bar-On et al., 2013). Le Nkp46 serait également impliqué dans la reconnaissance et la lyse de cellules tumorales (Halfteck et al., 2009) via la reconnaissance de ligand non identifiés.

NKp44 : Cette glycoprotéine de type I de 44 kDa est codée par le gène NCR2 situé également sur le chromosome 6. Contrairement aux récepteurs NKp46 et NKp30, il s'associe à la molécule DAP12/KARAP par l'intermédiaire d'une lysine (K) présent dans la séquence transmembranaire. Il se distingue par un domaine immunoglobulinique extracellulaire de type V et n'est exprimé qu'à la surface des cellules NK activées par l'IL-2 (Vitale et al., 1998). Le récepteur NKp44 a pour ligands les hémagglutinines du virus influenza (Arnon et al., 2005; Ho et al., 2008), les glycoprotéines de l'enveloppe des virus de la Dengue et du West Nile (Hershkovitz et al., 2009) et les protéines de diverses bactéries conduisant à l'activation de la cellule NK (Esin et al. 2013). A l'inverse, une étude a montré que la reconnaissance du facteur PCNA (Prolifération Cell Nuclear Antigen) par le récepteur NKp44 induisait l'inhibition de l'activation des cellules NK (Rosental et al., 2011).

NKp30 : Ce récepteur est une glycoprotéine de 30 kDa codée par le gène NCR3 situé sur le chromosome 6 dans la région des molécules du CMHII. Il est exprimé spécifiquement sur les cellules NK dont les CD56^{bright}CD16⁻ et immatures CD34⁺ (Pende et al., 1999). Comme le NKp46, il est associé aux chaînes transductrices FcεRI-γ et CD3ζ par l'arginine de sa région transmembranaire. Le premier ligand identifié du NKp30 fût la protéine pp65 du Cytomégalo virus humain (HCMV) (Arnon et al., 2005). Il reconnaît aussi les ligands exprimés dans le cadre de stress cellulaire tel que BAT-3 (HLA-B-Associated Transcript 3), un facteur nucléaire impliqué dans l'apoptose, qui se retrouve exprimé à la surface des

cellules transformées ou sécrété sous l'effet d'un stress. Sa fixation au NKp30 induit alors l'activation de la cellule NK (Pogge von Strandmann et al., 2007). De même, la molécule B7-H6 liée au récepteur entraîne l'activation cellulaire (Brandt et al., 2009).

2B4 (CD244)

Ce récepteur fait partie des récepteurs de la famille du CD2 exprimés par les cellules NK dont le CD2, CD58, CD150, CD229, CS1 et NTB-A (McNerney and Kumar, 2006). Le gène codant la protéine CD244 est localisé en 1q22. Le récepteur 2B4 est exprimé par les cellules NK, les cellules T- $\gamma\delta$, les cellules T CD8+, une sous-population de cellules T CD4+, les monocytes et les basophiles (Assarsson et al., 2004). Il a la particularité d'être constitué, au niveau de sa partie extracellulaire, d'une région immunoglobulinique de type V reliée à un autre domaine Ig de type C2. La transduction du signal est assurée par une queue intracytoplasmique comprenant quatre domaines à tyrosine ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) avec le motif TIYxx(I/V) qui recrute les protéines adaptatrices SH2: SAP/SH2D1A/DSHP et EAT-2/SH2D1B (Claus et al., 2008). Le principal ligand décrit est le CD48. Cette interaction pourrait être impliquée dans les réponses à l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) (Moretta et al., 2001).

DNAM-1 (CD226)

Le DNAM-1(DXAX accessory molecule-1) est une glycoprotéine d'environ 65 kDa possédant deux domaines Ig de type V. Il est exprimé à la surface des cellules NK, des monocytes et une portion de cellules B. Le gène qui code le DNAM-1 est situé en 18q22.3 (Shibuya et al., 1996). Il possède deux ligand fortement exprimés par les cellules carcinomateuses, les cellules de mélanomes et de neurinome (tumeur nerveuse bénigne appelée aussi gliome périphérique), mais pas par la majorité des lignées B transformées par EBV : le récepteur du Poliovirus (PVR, CD155) et la Nectine2 (CD112) (Bottino et al., 2003; Tahara-Hanaoka et al., 2004)..

Les récepteurs à la portion Fc des Immunoglobulines (Fc γ R)

Ces récepteurs Fc γ R sont les récepteurs pour la portion Fc des IgG. Ils ne possèdent pas de ligand propre mais nécessite, pour pouvoir exercer leurs fonctions, l'intermédiaire d'une IgG tel qu'un anticorps monoclonal fixé sur sa cible comme décrit précédemment. Les cellules NK ont montré leur rôle important dans le mécanisme d'ADCC impliquant les anticorps

thérapeutiques et expriment deux de ces récepteurs possédant un motif activateur ITAM : le FcγRIIC et le FcγRIIIA qui seront développés dans la troisième partie.

▪ Les récepteurs de la famille des lectines de type C

A la différence de leurs homologues inhibiteurs, les hétérodimères forment des récepteurs activateurs avec le NKG2C et NKG2E. Ils possèdent une lysine au niveau de la région transmembranaire permettant l'association avec la molécule adaptatrice DAP12. Le NKG2C a pour ligand des molécules non classiques HLA-E avec une affinité moindre que pour le récepteur inhibiteur.

NKG2D (CD314)

Parmi les récepteurs activateurs de la famille des lectines de type C, on retrouve le NKG2D (Natural Killer Group 2)/CD314 dont le gène est situé sur le chromosome 12 chez l'Homme. Il est exprimé par les cellules NK, les lymphocytes T CD8 activés et Tγδ, les macrophages activés et une population particulière de cellules dendritiques telles que les IKDCs (*Interferon-producing Killer Dendritic Cells*) (Chan et al., 2006). Il a la particularité de ne pas s'associer au CD94 mais est exprimé au niveau de la membrane cellulaire sous forme d'homodimères (Bauer et al., 1999). Toutefois, il est associé à la chaîne transductrice DAP10 (DNAX-Activating Protein of 10 kDa) qui possède un motif activateur de type YxxM (Wu et al., 1999; Billadeau et al., 2003). L'agrégation du NKG2D induit la cytotoxicité des cellules NK mais pas la synthèse de cytokines (Billadeau et al., 2003). Ce récepteur a la capacité d'interagir avec plusieurs protéines dont l'expression est inductible lors d'un stress cellulaires résultant d'une infection, d'une tumorigenèse ou encore d'un choc thermique (Groh et al., 1996). Les ligands du NKG2D ont une structure proche des molécules de classe I du CMH. Deux familles ont été identifiées chez l'Homme : la famille des MICs (*MHC-class-I-polypeptide-related sequence*) dont MICA et MICB, et la famille des protéines ULBPs (*CMV UL-16-binding protein*) ou RAET1 (*Retinoic acid early transcripts-1*) dont ULBP1-4 et RAET2G (Bahram et al., 2005; Eagle and Trowsdale, 2007). In vivo, le NKG2D joue un rôle important dans l'immunosurveillance des tumeurs, des infections virales et bactériennes (Ogasawara and Lanier, 2005). MICA possèdent des polymorphismes qui influenceraient la stabilité d'interaction avec NKG2D. Ainsi, la diversité d'affinité des ligands pour le récepteur pourrait jouer un rôle dans l'intensité du signal expliquant de ce fait certaines pathologies. Les ligands de NKG2D peuvent ainsi être considérées comme cibles thérapeutiques (pour revue Spear et al., 2013).

NKp80 (KLRF1)

Ce récepteur membranaire de type II est exprimé sous forme d'homodimères spécifiquement à la membrane des cellules NK (Vitale et al., 2001). Son gène est localisé en 12q13.31. Il est constitué d'un domaine extracellulaire de type lectine C, d'une partie transmembranaire et intra-cytoplasmique associée à deux motifs à tyrosine de type (E/K)xYxx(L/T) (Vitale et al., 2001). L'association du récepteur à son ligand (AICL : *Activation-Induced C-type Lectin*) induit la mobilisation du calcium intracellulaire, la cytotoxicité et la synthèse cytokinique (Vitale et al., 2001; Welte et al., 2006). Cependant les cellules infectées par KSHV (*Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*) perdraient l'expression de la protéine AICL sous l'action de la ligase virale entraînant un mécanisme de protection contre la cytotoxicité médiée par les cellules NKp80⁺ (Thomas et al., 2008).

5) Éducation des cellules NK : tolérance du soi et activation

Les cellules NK sont capables d'éliminer sans immunisation préalable les cellules tumorales ou infectées par un pathogène tout en tolérant les cellules saines, par l'intermédiaire de l'équilibre dynamique des signaux transmis par les récepteurs activateurs et inhibiteurs membranaires. Plusieurs hypothèses résultent des différents travaux menés pour comprendre ce phénomène de tolérance des cellules NK vis-à-vis des cellules du Soi ainsi que les mécanismes permettant l'acquisition des fonctions effectrices.

a) Les premières théories

- **Hypothèse de la reconnaissance du soi manquant ou « missing-self »**

Kärre et son équipe ont observé que les cellules NK lysaient préférentiellement les cellules cibles qui n'exprimaient pas les molécules du CMH-I (Kärre et al.). Cette théorie part du principe qu'en condition basale toutes les cellules nucléées de l'organisme expriment constitutivement les molécules du CMH-I à leur surface et que cette expression s'en trouve fortement diminuée voire perdue lors d'un stress tumoral. Les cellules NK reconnaîtraient le « soi manquant » entraînant leur activation tandis que les cellules saines seraient protégées de la cytotoxicité des cellules NK par l'engagement des récepteurs inhibiteurs contrôlant leur activation.

- **Hypothèse du « at least one »**

Les études moléculaires des récepteurs inhibiteurs ont notamment permis de déterminer les acteurs de cette reconnaissance de manière plus précise et ont permis d'observer que l'expression à la surface des cellules NK de ces récepteurs spécifiques des molécules du CMH de classe I était très variable d'un individu à l'autre. Valiante et son équipe ont proposé que, pour induire la tolérance des cellules du Soi, la cellule NK mature fonctionnellement devait posséder au moins un récepteur inhibiteur spécifique des molécules du CMH-I de l'hôte (Valiante et al., 1997). Différents mécanismes furent proposés afin d'expliquer l'acquisition de l'expression d'au moins un récepteur inhibiteur spécifique des molécules du CMH-I par les cellules NK (Raulet, 2006; pour revue Raulet and Vance, 2006).

b) La théorie de l'Éducation ou « Licensing »

Cette théorie la plus actuelle explique la nécessité de l'engagement des cellules NK avec le CMH-I du Soi pour obtenir une réactivité : le licensing. En outre, processus est variable selon le mode d'activation cellulaire (Kim et al., 2005). Il est à noter que les récepteurs inhibiteurs et les ligands s'acquièrent par des processus génétiques indépendants (Parham, 2005b; Andersson et al., 2009). Ainsi, les cellules NK peuvent exprimer un récepteur inhibiteur sans son ligand correspondant et inversement. Seules les cellules NK exprimant les récepteurs inhibiteurs spécifiques de leurs phénotypes HLA de classe I sont alors capables de fournir une réponse fonctionnelle (Kim et al., 2005; Yokoyama and Kim, 2006; Kim et al., 2008). Cependant les cellules NK non fonctionnellement compétentes sont également tolérantes.

▪ Le modèle « *arming* »

D'après ce modèle, les cellules NK immatures sont hypo-réactives. Le licensing des cellules NK est induit par l'interaction d'un récepteur inhibiteur exprimé en surface et le CMH-I d'une cellule saine du soi. Le signal consécutif à l'engagement du récepteur inhibiteur favoriserait la maturation fonctionnelle de la cellule NK (Kim et al., 2005; Yokoyama and Kim, 2006; Kim et al., 2008).

▪ Le modèle « *disarming* »

Ce modèle va à l'inverse du premier et propose que les cellules NK soient réactives par défaut dès le début de leur développement via leur interaction avec les cellules présentes dans leur environnement direct. Ainsi l'hypo-réactivité des cellules NK vient de l'absence de signal inhibiteur, soit due à l'absence de présentation de molécules du CMH-I par les cellules environnantes soit due à l'absence de récepteur inhibiteur spécifique du soi à la surface de la cellule NK. Cet état d'anergie de la cellule NK s'explique par une stimulation persistante qui n'est pas contrebalancée par le signal inhibiteur. Par conséquent, le potentiel auto-réactif des cellules NK serait d'après ce modèle due à l'absence d'inhibition.(pour revue Raulet and Vance, 2006) .

▪ Le modèle du rhéostat

Parmi une population de cellule NK, des sous-populations peuvent se distinguer en fonction de l'expression des récepteurs inhibiteurs (Kusumi et al., 2006). Comme décrit

précédemment, les récepteurs inhibiteurs sont exprimés de manière différentielle à la surface des cellules NK humaines entraînant une grande hétérogénéité dans les réponses fonctionnelles. Raulet et son équipe ont montré que, chez la souris, l'éducation des cellules NK était quantitativement et qualitativement modulable selon respectivement le nombre de récepteurs inhibiteurs engagés. Ainsi, la réactivité des cellules NK murines serait corrélée avec le nombre de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH-I exprimés en surface (Raulet, 2006). Chez l'Homme, l'interaction des molécules de classe I du CMH et des KIR inhibiteurs est également impliquée dans l'éducation fonctionnelle des cellules NK humaines (Anfossi et al., 2006; Juelke et al., 2009; Fauriat et al., 2010a). De ce fait, plus les cellules NK expriment de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH-I, plus leur réactivité augmente vis-à-vis des cellules cibles et par conséquent leurs capacités effectrices (Joncker et al., 2009). La réactivité des cellules NK est donc comparable à un rhéostat où l'absence de récepteur inhibiteur à la surface cellulaire est associée à la déficience de réponse fonctionnelle et à l'inverse les capacités fonctionnelles des cellules NK dépendent des interactions de leurs récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH-I et augmentent avec le nombre de récepteurs engagés. La grande variabilité d'expression des récepteurs inhibiteurs suggèrent qu'ils pourraient être impliqués dans l'hétérogénéité fonctionnelle. En outre, l'expression d'un récepteur inhibiteur particulier à la surface d'une cellule NK éduqué pourrait être associée à une réponse fonctionnelle spécifique.

III) Les FcγR des cellules NK

Comme exposé précédemment, les récepteurs FcγR ont la particularité de lier la portion Fc des IgG, la lettre γ désignant l'isotype de la chaîne lourde caractéristique des IgG. Ces récepteurs ont fait récemment l'objet de nombreuses études suite à l'utilisation des anticorps monoclonaux en thérapeutique afin de mieux en comprendre les mécanismes d'action.

1) Caractéristiques générales des FcγRs

Ils appartiennent à la super famille des Immunoglobulines et sont codés par des gènes situés sur le chromosome 1 au niveau des régions q21-23 chez l'Homme et sur le chromosome 1 et 3 chez la souris. Les FcγR sont divisés en trois classes chez l'Homme: FcγRI, FcγRII et FcγRIII correspondant respectivement aux CD64, CD32 et CD16. Les différentes formes de récepteurs FcγRI, FcγRII (FcγRIIA, FcγRIIB et FcγRIIC), FcγRIII (FcγRIIIA et FcγRIIIB) et FcγRIV uniquement présent chez la souris se distinguent en termes de structure (nombre de domaines extracellulaires et enchâssement dans la membrane cellulaire) et/ou de fonction (motif de signalisation) (Figure 11).

Les études de cytométrie en flux et de résonance plasmonique de surface ont mis en évidence les différences d'affinité et d'avidité entre les 3 types de FcγR vis-à-vis des sous-classes d'IgG (Koene et al., 1997; Bruhns et al., 2009; Bruhns, 2012). Ainsi, chez l'Homme, le FcγRI est le seul FcγR humain à posséder une forte affinité pour les IgG. Le FcγRII et le FcγRIIIB présentent une faible affinité ($K_a < 10^7 \text{M}^{-1}$) tandis que le FcγRIIIA possède une affinité intermédiaire ($K_a = 2,7 \cdot 10^7 \text{M}^{-1}$). Chez la souris, le FcγRIV est un récepteur de forte affinité restreinte aux IgG2a et IgG2b murines (Nimmerjahn et al., 2005; Bruhns, 2012), et est capable, avec le FcγRIIB et le FcγRIII de se fixer aux IgE (Bruhns, 2012), le FcγRII et le FcγRIII possède une faible affinité et le FcγRI a une affinité intermédiaire pour les IgG murines. Le FcγRIII est le seul récepteur murin à pouvoir se fixer aux IgG1 murine.

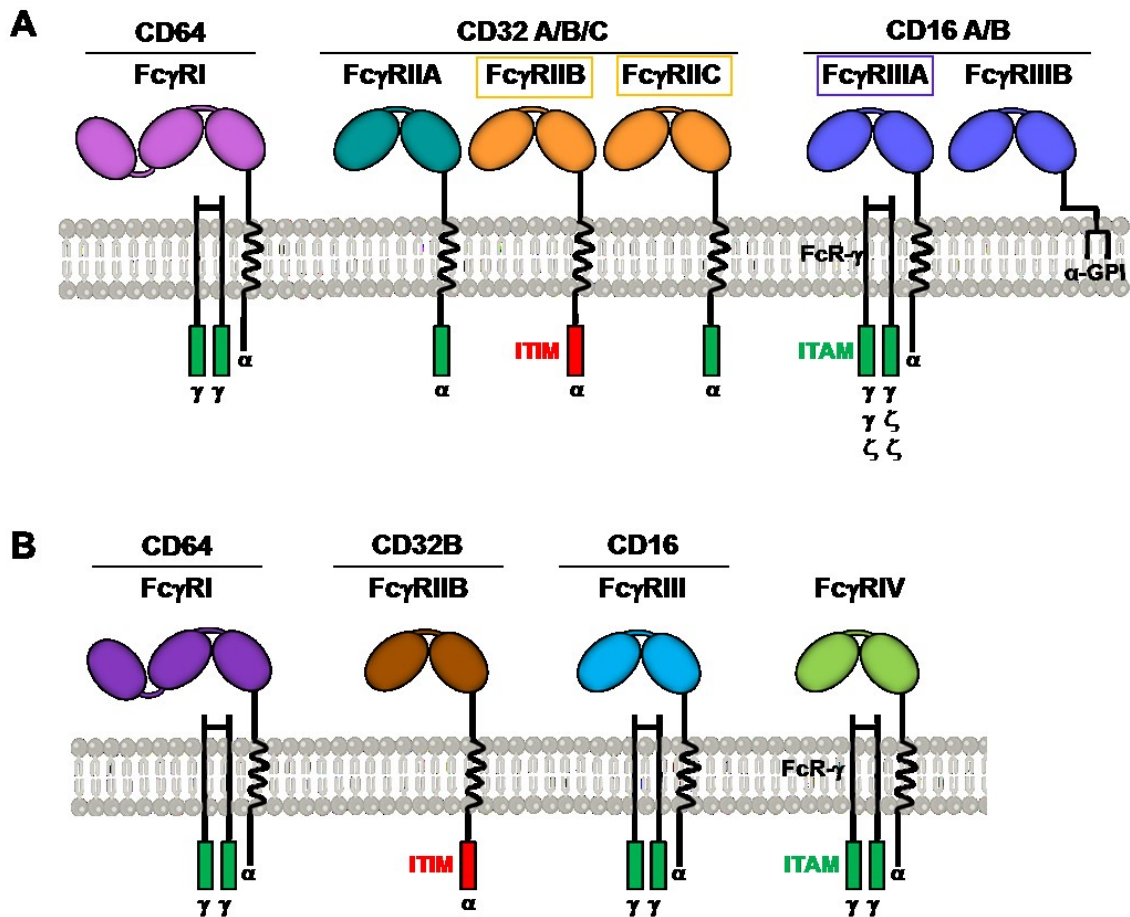


Figure 11: Représentation schématique de la structure des récepteurs de la portion Fc des immunoglobulines G. (A) Les FcγR humains, avec les récepteurs exprimés à la surface des cellules NK dans les encadrés (B) Les FcγR murins. (D'après Bruhns, 2012)

2) Le FcγRIIB

Les récepteurs CD32 fixent préférentiellement les IgG1 et IgG3 et peu ou pas les IgG2 et IgG4 (pour revue Gessner et al., 1998). Ils sont codés par trois gènes situés en 1q23 : FCGR2A, FCGR2B et FCGR2C. Le FcγRIIB possède un motif consensus unique, I/V/L/S-x-x-L/I-x-x-L/V (Muta et al, 1994), formant le motif ITIM qui ne nécessite pas l'association à des chaînes accessoires et met en jeu des voies de signalisation inhibitrices. Ainsi il module négativement l'activation cellulaire déclenchée par les récepteur activateurs de surface (Amigorena et al., 1992; Daëron et al., 1995) et par conséquent les réponses effectrices (Clynes et al., 2000). Il est fortement exprimé à la surface des cellules B, des basophiles et sur environ 20% des monocytes et 4% des neutrophiles (Veri et al., 2007). En 2008 Dutertre et son équipe ont également montré la présence du FcγRIIB à la surface d'une fraction très minoritaire des cellules NK (Dutertre et al., 2008).

3) Le FcγRIIC

Au niveau structural, les domaines extracellulaires et transmembranaires du FcγRIIC sont identiques au FcγRIIB. Il partage donc la spécificité de liaison du FcγRIIB tandis qu'il induit un signal activateur empruntant la voie de signalisation d'un récepteur à motif ITAM-like identique à celui du FcγRIIA (Warmerdam et al., 1993; Van den Herik-Oudijk et al., 1995;b). Il est capable de fixer des IgG1, 3 et 4 humaines complexés (Bruhns et al., 2009). Il est exprimé à la surface des cellules NK, des monocytes/macrophages et des neutrophiles (Bruhns, 2012). Ce récepteur possède un polymorphisme pour lequel la substitution nucléotidique aura comme conséquence la présence d'une glutamine (Q) en position 57 de l'ADNc et donc l'apparition d'un codon stop expliquant l'absence de son expression à la surface des cellules NK chez 50 à 60 % des donneurs (Metes et al., 1999; van der Heijden et al., 2012). En 1994, Metes et son équipe ont montré que les cellules cibles (cellules du mastocytome P815) exprimant les récepteurs au fragment Fc des IgG murines FcγR⁺ permettent de recouvrir les cellules NK FcγRIIC⁺ par des Ac anti-CD32 induisant l'agrégation du récepteur FcγRIIC. La formation d'un conjugué effecteur/cible ainsi créée entraîne la lyse de la cellule cible par les cellules NK (Metes et al., 1994). Hormis ce mécanisme d'ADCC redirigé, aucun mécanisme de défense immunitaire n'a été montré impliquant le FcγRIIC des cellules NK.

4) Le FcγRIIIA ou CD16A

a) Structure et signalisation cellulaire

Le récepteur FcγRIIIA/CD16A, l'un des récepteurs de faible affinité pour la portion Fc des IgG, fixe préférentiellement les IgG1 et les IgG3. Cette glycoprotéine transmembranaire est codée par le gène *FCGR3A* situé en 1q23. Elle est constituée de 2 domaines extracellulaires de type immunoglobulinique (EC1 et EC2 : Extracellular domain 1 et 2) regroupant 190 acides aminés, d'une courte séquence de 20 acides aminés correspondant à la partie juxta-membranaire de la protéine ou « stalk region ». Cette dernière fait la liaison entre le domaine EC2 et la région transmembranaire de type I de 21 acides aminés dont un résidu chargé permettant une association aux dimères de chaîne transductrice, et une courte région intracytoplasmique de 25 acides aminés. Ce récepteur est associé comme les récepteurs « classiques » des cellules NK à des chaînes de transduction du signal activateur:

hétérodimères FcεRIγ ou CD3ζ ou des hétérodimères, indispensables à son expression à la surface cellulaire (Altin, 1994).

b) Expression cellulaire et fonctions

Le FcγRIIIA est exprimé par la majorité des lymphocytes NK CD56^{dim}, par une fraction des lymphocytes Tαβ (Clémenceau et al., 2008) et γδ (Lafont et al., 2001; Angelini et al., 2004), par une fraction des monocytes et macrophages (Passlick et al., 1989) et par certaines cellules dendritiques. Toutefois, les réponses fonctionnelles induites par l'engagement du FcγRIIIA vont dépendre de la cellule effectrice sur laquelle il est exprimé.

A la surface des cellules NK, il s'agit d'un récepteur très puissant puisque son seul engagement suffit à induire deux types de réponses fonctionnelles : la cytotoxicité par le mécanisme d'ADCC précédemment exposé ainsi que la production de cytokines telle que l'IFN-γ (Bryceson et al., 2006). Cette capacité le différencie des autres récepteurs activateurs des cellules NK qui ont besoin d'être co-engagés pour provoquer ces deux réponses (Fauriat et al., 2010b).. Le mécanisme d'ADCC impliquant les lymphocytes Tγδ a également été rapporté (Chen and Freedman, 2008). Une des fonctions les plus importantes des monocytes et des macrophages est la phagocytose de molécules ou de cellules opsonisées par des IgG, permettant l'élimination de microorganismes et/ou de cellules anormales. Les études *in vitro* ont permis de mettre en évidence le rôle de FcγRIIIA dans la phagocytose de particules opsonisées (Indik et al., 1995). Toutefois, les monocytes CD16⁺ du sang périphériques ont une activité de phagocytose moindre comparativement à la majorité des monocytes qui sont phénotypiquement CD14⁺CD16⁻. En revanche, ils produisent plus de cytokines pro-inflammatoires (Passlick et al., 1989) telles que TNF-α et d'IL-12 (Ziegler-Heitbrock, 2007) et d'IL-10 (Skrzeczyńska-Moncznik et al., 2008). Finalement la présentation antigénique est une autre fonction que peut jouer le FcγRIIIA à la surface des macrophages et des cellules dendritiques permettant d'activer une réponse immunitaire adaptative. En effet, la capacité d'endocytose du récepteur permet la présentation de l'antigène restreinte par les molécules de CMH de Classe I et II dans les macrophages (Amigorena and Bonnerot, 1999) et dans les cellules dendritiques (Regnault et al., 1999). Plus récemment, Abès et son équipe ont montré la mise en place d'une immunité anti-tumorale adaptative par un AcMo anti-CD20 chez des souris immunocompétentes porteuses de tumeurs CD20⁺ disséminées et impliquant le FcγRIIIA (Abès et al., 2010).

c) Polymorphismes

Le gène FCGR3A présente un premier polymorphisme correspondant à la substitution d'une Thymidine par une Guanine en position 559 de l'ADNc qui induit la substitution en position 158 d'une Valine (V) par une Phenylalanine (F). Ce polymorphisme implique la présence de trois génotypes différents chez les individus : homozygotes FcγRIIIA-158V/V ou F/F, ou hétérozygotes FcγRIIIA-158V/F. Les études ont montré que ce polymorphisme pourrait influencer la susceptibilité à certaine maladie et pourrait être plus particulièrement un facteur de prédisposition aux maladies auto-immunes telles que le Lupus Érythémateux Disséminé (LED) (Salmon et al., 1984; Koene et al., 1998) ou encore la polyarthrite rhumatoïde (Nieto et al., 2000). La cristallographie a permis d'apprécier les interactions moléculaires existantes entre le FcγRIIIA et l'IgG et a ainsi montré que l'acide aminé impliqué dans le polymorphisme se situe dans le site de liaison du récepteur à l'IgG (Sondermann et al., 2000) (Figure 12). Bien que ce polymorphisme n'ait pas d'influence sur l'expression du FcγRIIIA à la surface cellulaire (Congy-Jolivet et al., 2008), il a pour conséquence une meilleure affinité du récepteur FcγRIIIA-158V pour les IgG (Dall'Ozzo et al., 2004) et une meilleure réponse clinique des individus homozygotes pour l'allèle V comparativement aux individus porteurs de l'allèle F (VF et FF) (Cartron, 2002).

Le second est un polymorphisme tri-allélique situé dans le domaine EC1 en position 48 (Histidine (H), Leucine (L), Arginine (R)). Le remplacement d'une Thymidine par une Guanine en position 230 de l'ADNc entraîne la substitution d'une Leucine par une Arginine tandis que le remplacement de la Thymidine par une Adénine induit la substitution d'une Arginine par une Histidine. De Haas et son équipe ont montré que le FcγRIIIA-48R et le FcγRIIIA-48H ont une meilleure affinité pour les IgG1, IgG3 et IgG4 que le FcγRIIIA-48L (de Haas et al., 1996). Cette différence d'affinité est en réalité due au fait que ce polymorphisme est en déséquilibre de liaison avec le polymorphisme V158F (Koene et al., 1997). Les individus homozygotes FF sont L48L, tandis que les hétérozygotes LR et LH sont tous porteurs de l'allèle V (Koene et al., 1997).

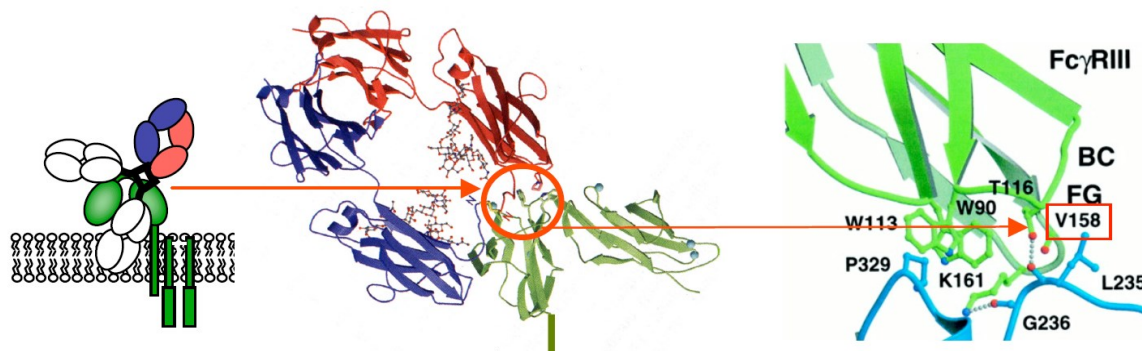


Figure 12 : Schéma de l'interaction entre le domaine EC2 du FcγRIIIA/CD16A et la portion Fc de IgG avec la représentation cristallographique et l'agrandissement de la zone de contact des deux protéines contenant l'acide aminé responsable du polymorphisme FcγRIIIA-V158F (d'après [Sondermann et al., 2000](#))

d) Les FcγR homologues

▪ Le FcγRIIIB (CD16B) humain

Le récepteur FcγR de type 3 existe sous deux isoformes chez l'Homme: FcγRIIIA (CD16A) et FcγRIIIB (CD16B) (Figure 11A). Le CD16A et le CD16B sont codées par deux gènes très homologues et la séquence qui constitue la région extracellulaire est identique à 96% (Ravetch and Perussia, 1989). La différence majeure entre les deux protéines est la présence d'une serine en position 203 pour le FcγRIIIB/CD16B lui conférant une insertion à la membrane par un ancrage GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) (Scallon et al., 1989; Selvaraj et al., 1988). Il existe trois variants pour ce récepteur : NA1, NA2 et SH (Huizinga et al., 1990; Bruhns, 2012). Les polymorphismes n'ont pas montré de différence d'affinité pour le ligand, cependant NA2 présente une capacité moindre à la phagocytose (Salmon et al., 1990). Le récepteur FcγRIIIB/CD16B est exprimé spécifiquement à la surface des polynucléaires neutrophiles (Huizinga et al., 1988) où il est régulé négativement par un mécanisme enzymatique faisant intervenir ADAM17 et ADAM10, des enzymes de la famille des métalloprotéases (Middelhoven et al., 1997; Bergin et al., 2010; Guo et al., 2012; Wang et al., 2012). Cependant, la présence du récepteur FcγRIIIB/CD16B à la surface de basophiles a récemment été montrée (Meknache et al., 2009).

▪ Le FcγRIV

Ce récepteur fût découvert en 2005 (Nimmerjahn et al., 2005) et n'existe pas chez l'homme mais chez les rongeurs tels que les souris, les rats et les hamsters (Bruhns, 2012). Il a

besoin d'être associé à la chaîne transductrice FcR γ comme le Fc γ RI et III murins pour pouvoir effectuer ses fonctions de récepteur activateur (Figure 11B). Le Fc γ RIV est un récepteur d'affinité intermédiaire pour les IgG2a ($K_a=2,910^7M^{-1}$) et IgG2b ($K_a= 1,710^7M^{-1}$) murines (Mancardi et al., 2008). Bien que le récepteur Fc γ RIV soit exprimé par les cellules effectrices telles que les monocytes, macrophages, cellules dendritiques mais non par les cellules NK comme le Fc γ RIII murin (Mancardi et al., 2008; Bruhns, 2012), il est considéré comme l'homologue fonctionnel du Fc γ RIIIA humain (Mechetina et al., 2002; Nimmerjahn et al., 2005).

5) Mécanisme de régulation négative

Il a été rapporté qu'après leur activation, les cellules NK perdent l'expression du récepteur Fc γ RIIIA/CD16A en surface. Les mécanismes de régulation négative du récepteur sont au nombre de trois:

a) Shedding

Bien qu'il soit présent à la surface cellulaire, une fraction soluble du Fc γ RIII/CD16 est détectable dans la salive, le fluide séminal, le sérum et le plasma (Sautès et al., 1992; de Haas et al., 1994; Huizinga et al., 1990; Koene et al., 1996; Galon et al., 1998) dans les conditions dites « normales » et « pathologiques ». Chez un individu sain, le niveau de CD16 soluble circulant dans le plasma est d'environ 1 μ g/mL (Teillaud et al., 1994) et la quantité de cette fraction soluble de CD16 augmente et est corrélée avec la progression de certaine maladie telle que l'arthrite rhumatoïde (de Haas et al., 1994; Masuda et al., 2003), les mylomes (Mathiot et al., 1996), l'athérosclérose (Masuda et al., 2003) ou encore l'infection par le VIH (Khayat et al., 1990). La majorité du CD16 soluble dans le plasma provient du CD16B décapé à la surface des neutrophiles (Ravetch and Perussia, 1989; Huizinga et al., 1990) et des cellules NK (de Haas et al., 1994). En effet, le Fc γ RIIIA/CD16A est également connu pour être décapé de la surface de la cellule NK par un mécanisme enzymatique faisant intervenir une métalloprotéase (Harrison et al., 1991; Borrego et al., 1994). Toute activation de la cellule NK semble induire ce mécanisme (Borrego et al., 1994; Harrison et al., 1991; Grzywacz et al., 2007; Congy-Jolivet et al., 2008; Romee et al., 2013). En 1994, Borrego et son équipe ont montré que la 1.10 phénanthroline, un inhibiteur de métalloprotéase dépendante de zinc, empêchait le mécanisme de se produire. Bien que diverses études aient été menées depuis

pour tenter de déterminer le mécanisme de régulation négative du FcγRIIIA/CD16A à la surface des cellules NK, l'effecteur principal n'était pas identifié au démarrage de ce travail.

▪ Les métalloprotéases de la famille des ADAM

Les métalloprotéases constituent une famille d'enzyme de la classe des peptidases. Leur site actif contient un ion métallique qui participe à la catalyse de la coupure de la liaison peptidique dans les protéines. Cette famille d'enzyme inclue les ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) qui sont responsables de la perte d'expression membranaire d'un grand nombre de protéine par leur décapage en surface.

Généralités

Les ADAM sont des glycoprotéines transmembranaires de type I ou secrétées de la famille des Metzincines, qui inclue également les MétalloProtéases de la Matrice extracellulaire (MMPs) et les ADAMs à motifs TromboSpondin (ADAMTS), et de la sous-famille des métalloprotéases dépendantes de zinc, les Zincines. Leur analogie avec des métalloprotéases contenues dans le venin de serpent (SVMPs : Snake Venom MetalloProteinases) et les études de fertilité ont permis d'identifier ces protéines caractérisées par la présence de sites de fixation du zinc et d'une structure modulaire leur conférant des propriétés de protéolyse, d'adhésion et de signalisation (Primakoff and Myles, 2000). Les ADAM comprennent 33 membres chez les mammifères dont 21 potentiellement fonctionnelles chez l'homme (Yang et al., 2006). Seulement 13 possèdent une activité protéolytique dont le site catalytique est porté par le motif consensus HEXGHXXGXXHD (X, un acide aminé quelconque) située dans le domaine métalloprotéase (Figure 13).

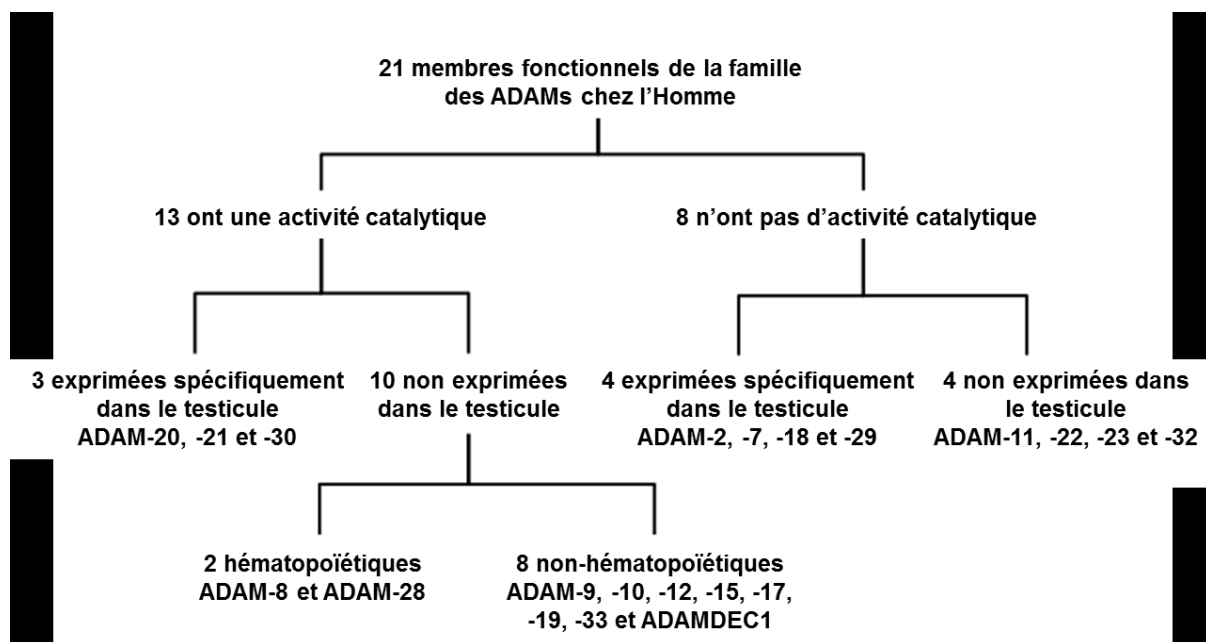


Figure 13: Représentation du classement des 21 ADAMs fonctionnelles chez l'Homme en fonction de leur capacité. protéolytique et de leur expression tissulaire (d'après Edwards et al., 2008)

Structures

Les ADAM sont composés d'environ 750 acides aminés. Leur structure très conservée entre les espèces comprend une partie extracellulaire incluant plusieurs domaines au rôle bien défini pour la majorité. À l'extrémité N-terminale se situe un peptide signal. Il est suivi du prodomaine qui possède une double fonction : celle de molécule chaperonne et d'inhibiteur de l'activité enzymatique puis du domaine catalytique (ou métalloprotéase) contenant l'atome de zinc nécessaire à l'activité enzymatique, du domaine désintégrine qui a la capacité de lier les intégrines impliquées dans l'adhésion cellulaire. Ensuite vient le domaine riche en cystéine qui pourrait participer à la reconnaissance des substrats (Reddy et al., 2000) ou encore à la maturation de l'enzyme (Milla et al., 1999), puis le domaine Epidermal Growth Factor (EGF)-like, excepté pour ADAM10 et 17, le domaine transmembranaire important aussi bien pour la localisation de l'enzyme que pour le contrôle de son activité et enfin la queue cytoplasmique impliquée dans la signalisation par la présence de sites de phosphorylation (Figure14)

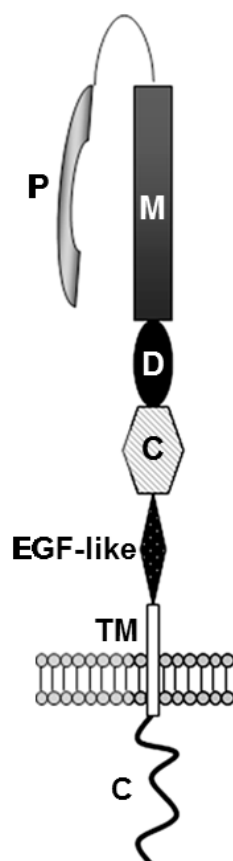


Figure 14: Représentation schématique de l'organisation de la structure multidomaine des métalloprotéases de la famille des ADAM (d'après Edwards et al., 2008). P = Prodomaine ; M = domaine métalloprotéase ; D = domaine désintégrine ; CR = domaine cystéine-rich ; EGF-like = domaine EGF-like ; TM = domaine transmembranaire ; C = queue cytoplasmique.

Le prodomaine

Situé en N-terminale, le prodomaine a pour rôle principal l'inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme (Moss et al., 2007). En effet, les ADAMs sont sous forme de zymogène. Le passage de la forme inactive à la forme active de l'enzyme se fait par un mécanisme de « cystéine-switch » qui consiste en une compétition entre la cystéine contenue dans le prodomaine et celle du domaine catalytique (ou domaine métalloprotéase) de l'enzyme pour l'atome de zinc présent également dans le domaine catalytique (Milla et al., 2006). L'affinité plus importante de la cystéine du prodomaine pour l'atome de zinc permet la latence de l'activité enzymatique tandis qu'au cours de la maturation, le prodomaine est clivé entraînant la dissociation des deux partenaires et rendant ainsi le site actif accessible. L'atome de zinc peut ainsi se lier à la cystéine dans le domaine catalytique pour l'activation de l'enzyme.

Cette fonction inhibitrice du prodomaine a été observé pour ADAM10 et la mutation de la cystéine induit une perte de cette propriété (Moss et al., 2007). Pour ADAM17, bien que le clivage du prodomaine soit nécessaire à sa maturation et à son activité catalytique (Peiretti et al., 2009; Li et al., 2009). la cystéine n'est pas impliquée dans l'inactivation de l'activité catalytique mais joue un rôle dans la stabilité de l'enzyme la protégeant ainsi de la dégradation (Li et al., 2009).

Le domaine métalloprotéase

Environ la moitié des ADAM humaines ont une propriété protéolytique induisant, par un mécanisme de clivage (ou shedding) au niveau juxta-membranaire, la libération dans le milieu extracellulaire de l'ectodomaine de diverses protéines membranaires impliquées dans des processus physiologiques. Ce mécanisme de shedding médié par le domaine métalloprotéase des ADAMs est observé pour des protéines telles que le TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire (Black et al., 2003), la L-sélectine ou VCAM-1, des molécules d'adhésion (Kahn et al., 1994; Singh et al., 2005).

Le domaine désintégrine

Ce domaine très conservé entre les espèces est composé de 60 à 90 acides aminés présentant une grande homologie avec ceux de la désintégrine contenue dans le venin de serpent (SVMP : Snake Venom MetalloProteinases). Le domaine désintégrine est aussi bien impliqué dans l'adhésion cellulaire que dans le contrôle de l'activité catalytique.

Le domaine riche en cystéine

Les propriétés de ce domaine ne sont pas clairement identifiées cependant il serait impliqué dans la spécificité de reconnaissance du substrat. En effet, le domaine « cystein-rich » contient une poche aux résidus acides qui liée à des complexe Récepteur/Ligand faciliterait le clivage efficace du ligand tandis que le clivage est empêché lorsque les résidus critiques au sein de la poche sont modifié.

Le domaine transmembranaire et cytoplasmique

Il permet l'ancrage de la protéine à la membrane cellulaire.

Fonctions biologiques et substrats

L'une des principales fonctions de ces enzymes est le relargage de l'ectodomaine des protéines membranaires (Figure 13). Toutefois, toutes ces sheddases possèdent de nombreux substrats aux propriétés très diverses tels que des cytokines associées à la membrane (Pro-TNF- α), des facteurs de croissance (TGF, EGF), des récepteurs membranaires (EGFR, IL6-R), des molécules d'adhésion cellulaire (L-sélectine, N-cadhérine). Parmi ces nombreuses sheddases, ADAM17 et ADAM10 sont les plus connues. ADAM17 ou TACE a été identifié pour la première fois comme l'enzyme responsable de la l'activation de la forme précurseur du TNF- α associée à la membrane (Pro- TNF- α) et donc de la présence du TNF- α dans le milieu extracellulaire (Black et al, 1997 ; Moss et al, 1997). Cette cytokine est impliquée dans certaines maladies associées à l'inflammation telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn et les cancers. ADAM10 est la principale enzyme impliquée dans la voie de signalisation du récepteur Notch1 (Pan and Rubin, 1997; van Tetering et al., 2009) qui est mis en cause dans de nombreux processus biologiques tel que la différenciation, le maintien du potentiel de différenciation, la mort cellulaire et même la cancérisation. Les ADAM17 et 10 sont donc de potentielles cibles thérapeutiques (Moss et al., 2008; Rose-John, 2013).

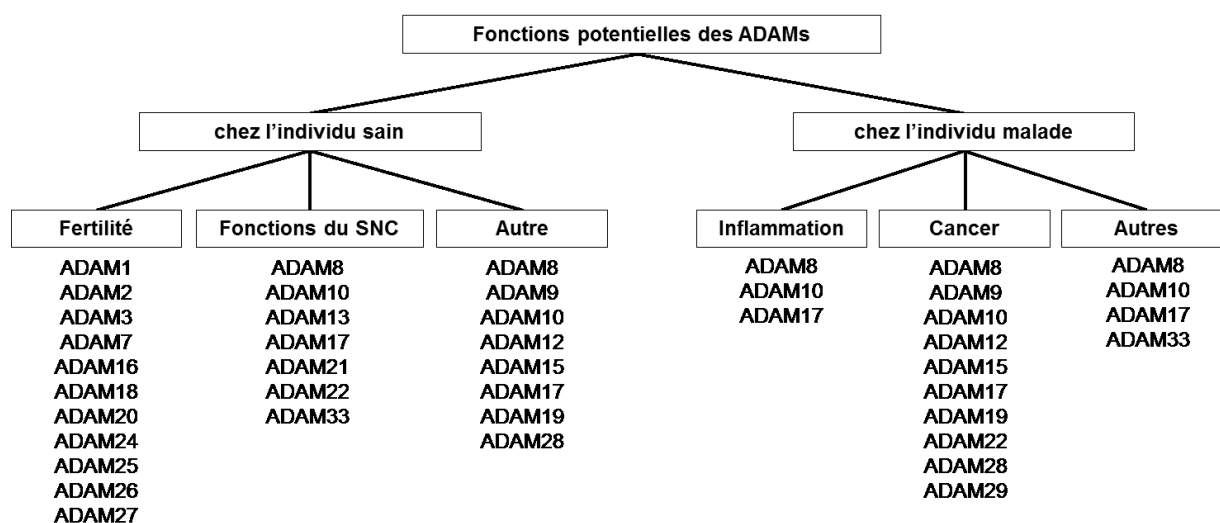


Figure 15 : Fonctions potentielles des ADAMs chez l'Homme (Reiss and Saftig, 2009). Les ADAMs jouent un rôle majeur dans la fertilité, le développement du système nerveux central (SNC) et cardiovasculaire chez l'individu sain. Toutefois la dérégulation de leurs fonctions peut être liée aux maladies inflammatoires, la progression de cancers ou encore aux maladies auto-immunes telle que l'arthrite rhumatoïde.

b) Internalisation

Le Fc γ RIIIA aurait la capacité d'être internalisé suite à son engagement impliquant certaines molécules de la voie de signalisation du récepteur. En effet, l'expression

membranaire du CD16 serait associée à celle de la phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC). Cecchetti et son équipe ont montré la co-localisation des deux molécules dans les radeaux lipidiques après activation des cellules NK suite à l'engagement du récepteur par un anticorps anti-CD16 montrant l'internalisation du récepteur et le rôle de la PC-PLC dans la régulation de l'expression du CD16 (Cecchetti et al., 2007).

c) Trogocytose

La trogocytose est un processus de transfert rapide et actif de molécules membranaires entre deux cellules immunitaires en contact. Ce phénomène peut-être déclenché par les récepteurs à l'antigène. Une cellule peut ainsi momentanément exposer à sa surface une protéine fonctionnelle dont elle ne transcrit pas le gène ou encore internaliser un complexe immun consécutivement à sa formation.

En 2008, Beum et son équipe ont mis en évidence le mécanisme de trogocytose réalisée par des cellules NK *in vitro*. Ces dernières au contact de cellules Daudi opsonisées par du rituximab vont, par l'intermédiaire du FcγRIIIA/CD16A, internaliser le rituximab et sa cible, la molécule CD20 exprimée par les cellules B, ainsi que le FcγRIIIA/CD16A (Beum et al., 2008).

OBJECTIFS

Présentation des objectifs de la présente thèse

Les études phénotypiques et pharmacogénétiques suggèrent que les cellules NK humaines CD56^{dim} FcγRIIIA/CD16A⁺ sont impliquées par le mécanisme d'ADCC dans l'effet thérapeutique des anticorps monoclonaux cytolytiques utilisés dans le traitement de cancer tels que le rituximab (Cartron, 2002; Weng and Levy, 2003; Veeramani et al., 2011), le trastuzumab (Musolino et al., 2008) et le cetuximab (Bibeau et al., 2009; Taylor et al., 2009). Cependant une perte d'expression membranaire du récepteur FcγRIIIA/CD16A est observée suite à l'activation cellulaire. En effet, le FcγRIIIA/CD16A est connu pour être décapé de la surface de la cellule NK par un mécanisme enzymatique faisant intervenir une métalloprotéase (Harrison et al., 1991; Borrego et al., 1994). Différentes activations de la cellule NK peuvent induire ce mécanisme : certaines dépendent de l'engagement du récepteur FcγRIIIA/CD16A par un Ac anti-CD16 (Borrego et al., 1994; Congy-Jolivet et al., 2008) ou par la portion Fc d'un AcMo thérapeutique tel que le rituximab (Bowles et al., 2006), d'autres sont indépendantes de cet engagement, lorsque par exemple les cellules NK sont incubées avec des cellules K562 (Grzywacz et al., 2007), ou stimulées par un ester de phorbol comme le PMA (Harrison et al., 1991). Toutefois, l'engagement du FcγRIIIA/CD16A par un Ac anti-CD16 peut également induire son internalisation (Cecchetti et al., 2007). En tenant compte de l'importance du FcγRIIIA/CD16A dans le mécanisme d'action des anticorps monoclonaux thérapeutiques, il était essentiel d'identifier le ou les mécanismes impliqués dans la disparition de l'expression membranaire du récepteur à la surface des cellules NK.

Le mécanisme de décapage induit par les ADAMs, aussi nommé « shedding », emprunte la voie de signalisation des MAP-kinases. ADAM17 et ADAM10 les plus connues sont des métalloprotéases zinc-dépendante très proches structurellement et fonctionnellement (Huovila et al., 2005). En effet, la séquence de leur site catalytique possède 50% d'homologie et leur activité enzymatique est très rapidement induite après l'activation des neutrophiles (Walcheck et al., 2006). ADAM17 ou TACE (*TNF-α Converting Enzyme*) initialement décrite comme l'enzyme responsable du clivage du pro-TNF-α membranaire entre l'alanine 75 et la valine 76 (Black et al., 1997, 2003), possède avec ADAM10 des substrats propres (Caescu et al., 2009).

L'EGF (*Epidermal Growth Factor*) est clivée exclusivement par ADAM10 (Yan et al., 2002) tandis que la CD62-L (*L-sélectine*) est décapée de la surface des leucocytes au niveau juxta-membranaire entre la lysine 321 et la Serine 322 spécifiquement par ADAM17 (Kahn et al., 1994; Condon et al., 2001). Cette molécule d'adhésion cellulaire, impliquée dans la domiciliation des lymphocytes vers les organes lymphoïdes secondaires (Gallatin et al., 1983) et dans l'orientation des polynucléaires neutrophiles vers les sites de l'inflammation (Jutila et al., 1989), est exprimée par une proportion des cellules NK (Frey et al., 1998; Juelke et al., 2010) à la surface desquelles est observée une variation d'expression de la glycoprotéine après activation cellulaire (Frey et al., 1998). Bien qu'ADAM17 et ADAM10 aient des sites préférentiels de clivage (Caescu et al., 2009), les deux enzymes possèdent des substrats communs et sont toutes deux impliquées dans le décapage du FcγRIIIB/CD16B la surface les polynucléaires neutrophiles selon le mode d'activation cellulaire (Middelhoven et al., 1997; Bergin et al., 2010; Guo et al., 2012; Wang et al., 2012). Le fait que le FcγRIIIA/CD16A et le FcγRIIIB/CD16B soient codés par deux gènes très similaires (Ravetch and Perussia, 1989), et que la courte séquence d'acides aminés situés entre la position 191 à 201 composant la partie juxta-membranaire (« stalk region ») des deux protéines soit identique et contienne le site potentiel de clivage du FcγRIIIB/CD16B situé d'après Galon et son équipe entre la valine 196 et la sérine 197 (Galon et al., 1998), nous a conduit à poser l'hypothèse qu'ADAM17 et/ou ADAM10 pouvaient être également les principales enzymes à l'origine du décapage du FcγRIIIA/CD16A à la surface des cellules NK. Le premier objectif de ce travail a été de vérifier cette hypothèse et d'étudier la relation entre le clivage du FcγRIIIA/CD16A et l'activation des cellules NK. Les méthodes expérimentales que nous avons choisis de mener pour y répondre seront détaillées ultérieurement et nous ont permis de déterminer l'un des mécanisme enzymatique en *cis* responsable de la disparition membranaire du FcγRIIIA/CD16A à la surface des cellules NK, d'en identifier le site de clivage particulier et enfin de corrélérer la modulation du FcγRIIIA/CD16A aux réponses fonctionnelles des cellules NK activées indépendamment de son engagement..

Le déclenchement des fonctions effectrices des cellules NK CD56^{dim} incluant la cytotoxicité et/ou la sécrétion de cytokines telles que l'IFN-γ et le TNF-α s'opère après leur activation induite par le co-engagement des récepteurs activateurs présents en surface. Ainsi, nous et d'autres avons montré que le degré d'activation varie et dépend du nombre de récepteurs activateurs engagés (Fauriat et al., 2010a; Lajoie et al., 2014) et que le FcγRIIIA/CD16A des cellules NK CD56^{dim} fait figure d'exception puisque son seul

engagement suffit à induire les deux types de réponses fonctionnelles (Bryceson et al, 2006 Lajoie et al, 2014). L'activation des cellules NK dépend d'une fine balance de signaux impliquant également leurs récepteurs inhibiteurs. Ces derniers incluent principalement le récepteur hétérodimérique de la famille des lectines de type C, le NKG2A/CD94, qui reconnaît les molécules HLA-E et les récepteurs KIR (Killer Ig-like receptor) tels que le KIR2DL1/CD158a spécifique des molécules HLA-C2 et le KIR3DL2/3/CD158b spécifique des molécules HLA-C1. Un stress de la cellule cible induit par exemple réduction ou une perte totale d'expression de certaines molécules du CMH-I. La diminution des signaux inhibiteurs délivrés par l'engagement des récepteurs inhibiteurs va induire l'activation cellulaire par la reconnaissance des ligands de stress, via les récepteurs activateurs, entraînant le déclenchement des fonctions effectrices vis-à-vis de la cellule cible. Les récepteurs inhibiteurs interviennent également au cours de la maturation des cellules NK dans l'acquisition de par une transformation tumorale ou une infection engendre une leurs capacités fonctionnelles. Seules les cellules NK qui expriment les récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules CMH de classe I du soi sont fonctionnellement compétentes et peuvent ainsi fournir une réponse effectrice (Kim et al., 2005; Yokoyama and Kim, 2006; Kim et al., 2008). L'acquisition des récepteurs inhibiteurs et des ligands dépend de processus biologiques indépendants (Parham, 2005b; Andersson et al., 2009). De plus, l'expression des récepteurs inhibiteurs est très variable d'un individu à l'autre et au sein d'une population de cellules NK d'un individu donné. L'association entre le défaut de réponse fonctionnelle et l'absence d'expression des récepteurs inhibiteurs, et à l'inverse, l'augmentation de la réactivité des cellules NK avec le nombre de récepteurs inhibiteurs (Joncker et al., 2009), suggère que l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules NK dépend au moins partiellement de l'expression individuelle des récepteurs inhibiteurs. Ainsi la réactivité des cellules NK est comparable à un rhéostat (Joncker et al., 2009) plus une cellule NK exprime de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH-I, plus ses capacités effectrices augmentent. Nous avons observés que les cellules NK polyclonales d'un individu sain activées par l'engagement du FcγRIIIA/CD16A par un anticorps anti-CD16 (3G8) ou par le co-engagement des récepteurs activateurs (Lajoie et al., 2014) présentent une dichotomie fonctionnelle : les cellules NK qui répondaient par la dégranulation étaient partiellement différentes de celles qui produisaient de l'IFN-γ. Ces résultats étaient en accord avec ceux rapportés antérieurement bien que non commentés spécifiquement par Anfossi et *al.* (Anfossi et al., 2006). Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que les réponses effectrices des cellules NK pourraient être associées à l'expression de récepteurs inhibiteurs particuliers, i.e.

certain récepteurs inhibiteurs pourraient être des facteurs prédictifs de la réponse effectrice des cellules NK. Le deuxième objectif de ce travail a été de déterminer si le NKG2A et les KIR (CD158A et CD158b) sont associés à une réponse fonctionnelle particulière des cellules NK activées par l'engagement du FcγRIIIA/CD16A. Pour vérifier ce postulat, nous avons mis en place une méthode de cytométrie en flux permettant de déterminer simultanément le phénotype membranaire des cellules NK qui dégranulent et/ou produisent de l'IFN-γ après l'engagement d'un seul récepteur activateur en absence de cellules cibles. Cette approche nous a permis de montrer que l'engagement du FcγRIIIA/CD16A à la surface des cellules CD56^{dim} induit une ségrégation fonctionnelle, i.e dégranulation et production d'IFN-γ, qu'il existe une importante variabilité inter-individuelle pour ces deux réponses fonctionnelles et que les cellules CD56^{dim} répondeuses ne présentent pas le même profil phénotypique : l'expression des récepteurs inhibiteurs influence la balance entre les deux réponses fonctionnelles induites par l'engagement du FcγRIIIA/CD16A.

Les récepteurs aux cytokines présents à la surface des cellules NK jouent également un rôle primordial dans leur différenciation, leur prolifération, leur migration et leur activation. L'interleukine-15 (IL-15) est une cytokine jouant un rôle crucial dans la différenciation des progéniteurs CD34⁺ en cellules NK, NK-T et Tγδ (T CD8⁺ mémoires), ainsi que dans l'homéostasie de ces cellules (Kennedy et al., 2000). Elle fait partie de la même famille que l'IL-2 et partage de ce fait *in vitro* une activité fonctionnelle proche. À la différence de l'IL-2, IL-15 est capable de diminuer la toxicité associée à la chimiothérapie avec une cytotoxicité six fois moindre (Munger *et al*, 1995). La signalisation de l'IL-15 est assurée, d'une part, par les chaînes réceptrices IL-15Rβ et γ, et d'autre part, par la chaîne réceptrice IL-15Rα. Cette dernière fixe l'IL-15 avec une forte affinité permettant la formation d'un complexe très stable, la spécificité de reconnaissance de la cytokine étant apportée par la chaîne α (Ma et al., 2006). De plus, l'IL-15 possède son propre mécanisme, la trans-présentation, par lequel les cellules présentatrice d'antigène telles que les macrophages et les cellules dendritiques exprimant l'IL-15Rα vont induire par la présentation en *trans* de l'IL-15, qu'elles produisent ou sa forme soluble issue d'un clivage enzymatique par une métalloprotéase (Mortier et al., 2004), une activation de forte affinité des cellules effectrices NK ou TCD8⁺ mémoires exposant en surface le complexe de transduction IL-15β/γ (Mortier et al., 2009). Par son mode d'action primordial *in vivo*, l'IL-15 possède une place majeure dans l'immunosurveillance tumorale (Burkett et al., 2004; Kobayashi et al., 2005). En 2006, Mortier et son équipe ont généré le complexe de fusion dans lequel le récepteur IL-15Rα est attaché par un lien peptidique à une

molécule d'IL-15, mimant le mécanisme de trans-présentation.(Mortier et al., 2006). Cette molécule, le RLI, a montré une meilleure activité biologique *in vitro* que l'IL-15 et une meilleure activité anti-tumorale *in vivo* dans les modèles de cancers murins et humains (Bessard et al., 2009). De plus, l'association de cette molécule à l'Ac anti-GD2 sous forme d'immunocytokine a montré un potentiel thérapeutique plus important que l'Ac anti-GD2 seul ou en combinaison avec le RLI. (Vincent et al., 2013a; c)

Le rituximab, un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le récepteur CD20 exprimé spécifiquement par les lymphocytes B, possède trois mécanismes d'action conduisant à la déplétion des cellules B (Boross and Leusen, 2012): l'ADCC, la CDC et l'induction de l'apoptose. Son intérêt thérapeutique dans les lymphomes B, notamment dans le traitement des lymphomes non-Hodgkinien, est bien établi (Glennie et al., 2007). Toutefois, Moga et ses collaborateurs ont rapporté que l'IL-15 augmenterait l'activité anti-tumorale *in vitro* du rituximab (ADCC) envers des cellules RAJI, une lignée de cellules B humaines issue de lymphome de Burkitt (Moga et al., 2008), et de cellules B provenant de patients atteints d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC) (Moga et al., 2011). Finalement, la troisième partie est consacrée à un travail collaboratif avec Agnès Quémener et Yannick Jacques de l'équipe « Cytokines et Récepteurs en immuno-Cancérologie » de l'UMR892-INSERM 6299-CNRS du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Anger. L'objectif était d'utiliser les techniques du laboratoire pour évaluer les réponses fonctionnelles des cellules NK induites par le rituximab couplé à l'IL15 sous forme d'immunocytokine. La méthode utilisée repose sur une technique brevetée mise au point au sein de notre laboratoire qui permet de déterminer simultanément, par cytométrie en flux, le nombre cellules NK qui ont dégranulé et le nombre de cellules NK qui ont produit de l'IFN- γ en réponse à différent stimulant dont l'engagement du récepteur Fc γ RIIIA/CD16A par des AcMo adsorbés sur un support solide. La dégranulation est mise en évidence par l'expression membranaire du CD107a, et la synthèse d'IFN- γ par marquage intracellulaire de la cytokine dont la sécrétion est inhibée par la présence de la bréfeldine A. L'absence de la cellule cible nous permet dans ces conditions de stimulation d'analyser et de comparer les réponses fonctionnelles des cellules NK en s'affranchissant de la source de variabilité liée à la cible. Les résultats correspondant spécifiquement à notre participation seront exposés de manière plus détaillée ultérieurement.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Une partie des techniques et du matériels utilisés sont déjà intégré dans les parties « Matériels et méthodes » des différents articles.

Les lignées cellulaires NK

Les lignées NK92 WT, NK92 hCD16 et NK92 hCD16(VA) ont été gracieusement fournis par Henri Vié et Béatrice Clémenceau de l'INSERM 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, France et toutes ont été cultivées en RPMI 1640 (Eurobio, Les Ulis, France) complété par 2mM de L-glutamine (Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgique), 1mM de pyruvate de sodium (Invitrogen SARL, Cerfy Pontoise, France), 50UI/ml de pénicilline et 50µg/ml de streptomycine (Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgique), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen SARL, Cerfy Pontoise, France) décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes et 100UI/mL d'IL2 (PROLEUKIN®, Novartis). Les lignées cellulaires NK92CD16 transfectées par les shRNA ADAM17 ont été cultivées dans le milieu identique à celui décrit précédemment supplémenté avec 1mg/ml G418 (Néomycine) obtenu par les laboratoires PAA (Les Mureaux, France).

Les anticorps monoclonaux

Le trastuzumab et le rituximab ont été gracieusement fournis par le CHRU de Tours. Les AcMo suivant, toutes des IgG1 murine, ont été utilisés : anti-CD16 clone 3G8, anti-CD16 clone 3G8 conjugué à la phycoerythro cyanyne 7 (CD16-PC7), et à l'Allophycocyanine-Alexa Fluor 750 (CD16-APC Alexa Fluor 750), l'anti-CD56 clone N901 conjugué à l'Allophycocyanine-Alexa Fluor 700 (CD56-APC Alexa Fluor 700) , l'anti-NKG2A clone Z199 conjugué à l' Allophycocyanine (NKG2A-APC), l'anti-CD158a clone EB6.B conjugué à la phycoerythrine (CD158a-PE), l'anti-CD158b clone GL183 conjugué à la phycoerythrino cyanyne 5.5 (CD158b-PeCy5.5), l'anti-CD107a clone H4A3 conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (CD107a-FITC), et les contrôles isotypiques proviennent du laboratoire Beckman Coulter (Villepinte, France). Les AcMo non conjugués ciblant les récepteurs activateurs (*i.e.* NKG2D/CD314 (clone 1D11), NKp30/CD337 (clone 4D12), NKp46/CD335 (clone 9E2), 2B4/CD244 (clone 2-69), l'anti-IFNγ clone B27 conjugué à la phycoerythrine

cyanyne 7 (IFN γ -PC7), et les contrôles isotypiques (IgG1 murines) viennent du laboratoire BD Biosciences (Le Pont de Claix, France).

Produits chimiques

Le Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et le N-éthylmaléimide (NEM) ont été fournis par le laboratoire Sigma (L'isles d'Abeau Chesne, France).

Transfection shRNA ADAM17 dans la lignée NK92CD16

Les 4 plasmides shRNA (sure silencing RNA) spécifiques du gène codant la protéine humaine ADAM17 et le plasmide contrôle négatif (CTR) proviennent du laboratoire Qiagen (Courtaboeuf, France). Les shRNA correspondent respectivement aux séquences suivantes :

shRNA(1)	5' -GAGTGGCGATCACGAGAACAA-3'
shRNA(2)	5' -GGAGTCCTGTGCATGTAATGA-3'
shRNA(3)	5' -GGTAGCAGATCATCGCTTCTA-3'
shRNA(4)	5' -GTGTGATCCTGGCATCATGTA-3'
shRNA(CTR)	5' -GGAATCTCATTTCGATGCATAC-3'

Les plasmides sont sous le contrôle du promoteur U1 et un gène de résistance à la néomycine pour une expression stable du shRNA dans les cellules NK92CD16.

Chaque plasmide a été transformé par amplification bactérienne dans des cellules compétentes E.coli selon le protocole « XL1-Blue Competent Cells » (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Puis une colonie par shRNA a été cultivé à plus grande échelle dans 250ml de milieu LB Broth Base (Invitrogen SARL, Cerfy Pontoise, France) supplémenté en ampicilline (1 μ g/ml) (Sigma, L'isles d'Abeau Chesne, France) et incubé 24h à 37°C sous agitation à 250rpm. Après centrifugation 15minutes à 50000 tour/min de 50mL de chacune des midiprep, les plasmides ont été purifiés à l'aide du kit EndoFree®Plasmid Purification Handbook (Qiagen, Courtaboeuf, France) d'après les instructions du fournisseur. La concentration nécessaire en antibiotique de sélection (Néomycine) pour la sélection ultérieure des clones a été déterminée à 1mg/mL. Pour chaque shRNA obtenus séparément, 2 μ g d'ADN plasmidique purifié a été nucléotransfectés dans les cellules d'intérêt (NK92CD16) par électroporation à l'aide de l'électroporateur Amaxa® Nucleofector® Technology (Lonza, Verviers, Belgique) selon le programme L-029 et du kit R Cell Line Nucleotransfector®

(Lonza, Verviers, Belgique) selon les recommandations du protocole fournis puis mis en culture en plaque 6 puits (Fisher Labosi, Elancour, France). La viabilité de la transfection a été vérifiée 48h après au microscope à fluorescence Evos® (Life technologies, Saint Aubin, France) à l'aide du plasmide contrôle GFP fournis. Les clones NK92CD16 shRNA ADAM17 ont été obtenus en dilution limite en plaque 96 puits. 12 clones par shRNA ainsi qu'un clone contrôle ont été sélectionnés et cultivés en plaque 6 puits puis en flasque 75cm² à bouchon ventilé (CORNING®).

RT-PCR quantitative d'ADAM17

L'évaluation de la quantité relative des transcrits ADAM17 de chaque clone a été réalisée à partir d'ADN complémentaire obtenu par rétro-transcription à partir de 1,6 µg ARNm. Ces derniers ont été obtenus par extraction utilisant le kit RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. Les rétro-transcriptions ont été réalisées avec des Random Hexamer Primer et la rétro-transcriptase RevertAid (Fermentas Life Science, Illkirch, France). L'amorce sens de la PCR de séquence 5'-CAGAACATGATCCGGAYGGT-3' est située au sein de l'exon 11 et l'amorce anti-sens de séquence 5'-ACTGTTCTGTCACTGCACT-3' correspond à un fragment chevauchant l'exon 12 et 13. L'amorce sens servant à l'amplification du gène de ménage G6PGH est 5'-ATCGACCACTACCTGGGCAA-3' et l'amorce anti-sens est 5'-TTCTGCATCACGTCCCGGA-3'. Les deux couples d'amorces ont été obtenus par le laboratoire Eurogenetec (Angers, France). Pour l'analyse des transcrits d'ADAM17 de chaque clone, 5µL d'ADNc dilué au 1/50^{ème} a été ajouté au mix de réactif contenant 0,5µM d'amorce sens et anti-sens ainsi que 10µL de LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Meylan, France). Chaque échantillon a été testé en triplicat avec le LightCycler®480 2.0 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Le programme d'amplification consiste en une incubation de 10 min à 95°C suivie de 40 cycles composés d'une étape de dénaturation de 15s à 95°C et d'une étape d'élongation de 60s à 60°C. Les résultats ont été analysés avec le logiciel d'analyse du LightCycler®480 2.0 utilisant la méthode des $\Delta\Delta C_t$ (Ct : Cycle Threshold)

RÉSULTATS

Première partie : Le mécanisme de décapage du FcγRIIIA/CD16A dépendant d'ADAM17 à la surface des cellules NK humaines activées avec l'identification du site clivage et la relation avec l'activation cellulaire

Article n°1

ADAM17-mediated shedding of FcγRIIIA on human NK cells: Identification of the cleavage site and relationship with activation.

Lajoie L, Congy-Jolivet N, Bolzec A, Gouilleux-Gruart V, Elodie Sicard E, Sung HC, Peiretti F, Moreau T, Vié H, Clémenceau B, Thibault G. *Journal of Immunology*. 2013

Introduction

Le FcγRIIIA/CD16A, l'un des récepteurs de faible affinité pour la portion Fc des IgG exprimé à la surface des cellules NK CD56^{dim} et impliqué dans le mécanisme ADCC, est décapé de la surface des cellules NK après leur activation.

Afin d'élucider le rôle d'ADAM17 et d'ADAM10 dans le mécanisme enzymatique entraînant la perte d'expression membranaire du FcγRIIIA/CD16A, de déterminer la localisation spécifique du site de clivage du récepteur et d'étudier la relation de ce mécanisme de régulation négative avec l'activation cellulaire, nous avons utilisé deux approches:

Au niveau moléculaire, nous avons 1) montré le clivage de l'ectodomaine d'une protéine recombinante FcγRIIIA/CD16A par des protéines recombinantes ADAM17 et ADAM10 par méthode ELISA, 2) montré le clivage par les mêmes enzymes d'un peptide fluorogénique dont la séquence est constituée des acides aminés situés entre la position 191 et 201 du CD16 et contenant le site potentiel de clivage du FcγRIIIB/CD16B par spectrométrie. Nous avons également 3) identifié par MALDI-TOF le site de clivage du FcγRIIIA/CD16A entre l'alanine en position 195 et la valine en position 196, soit un acide aminé en amont du site de clivage décrit pour le FcγRIIIB/CD16B et 4) montré la spécificité du site de clivage.

Au niveau cellulaire, nous avons 1) confirmé l'expression d'ADAM17 dans les cellules NK par Western blot et montré son expression membranaire par cytométrie en flux, 2) montré, par cytométrie en flux, la perte d'expression membranaire simultanée du FcγRIIIA/CD16A et du CD62L, un substrat spécifique d'ADAM17, à la surface des cellules NK activées par différents modes de stimulation indépendants de l'engagement du FcγRIIIA/CD16A, ainsi que l'effet d'inhibiteurs physiologique et pharmacologique spécifiques d'ADAM17 sur le mécanisme de décapage des deux protéines membranaires. Nous avons également montré 1) la forte corrélation entre le mécanisme de décapage du FcγRIIIA/CD16A et la dégranulation des cellules NK induites par le co-engagement de leurs récepteurs activateurs, et 2) l'absence de décapage dépendant d'ADAM17 du FcγRIIIA/CD16A par des cellules voisines (en *trans*) montrant qu'il s'agit d'un mécanisme qui fonctionne en *cis*. Finalement, nous avons complété notre travail par l'étude de la régulation du FcγRIIIA/CD16A à la surface des cellules NK consécutif à l'engagement du seul récepteur FcγRIIIA/CD16A et montré que le décapage par ADAM17 et l'internalisation

du récepteur sont les deux mécanismes responsables de la perte d'expression membranaire du récepteur dans ces conditions de stimulation.

ADAM17-Mediated Shedding of FcγRIIIA on Human NK Cells: Identification of the Cleavage Site and Relationship with Activation

Laurie Lajoie,^{*,1} Nicolas Congy-Jolivet,^{*,1} Armelle Bolzec,^{*} Valérie Gouilleux-Gruart,^{*,†} Elodie Sicard,^{*} Hsueh Cheng Sung,^{*} Frank Peiretti,[‡] Thierry Moreau,[§] Henri Vié,[¶] Béatrice Clémenceau,[¶] and Gilles Thibault^{*,†}

FcγRIIIA/CD16A, the low-affinity receptor for the IgG Fc portion expressed on human CD56^{dim} NK cells and involved in Ab-dependent cell cytotoxicity, is shed upon NK cell activation. We found that recombinant a disintegrin and metalloprotease (ADAM) 17 cleaved the ectodomain of FcγRIIIA/CD16A and a peptide for which the sequence encompasses aa 191–201 of the FcγRIIIA/CD16A stalk region but not ADAM10. MALDI-TOF analysis revealed that the peptide was cleaved between Ala¹⁹⁵ and Val¹⁹⁶ (i.e., 1 aa upstream of the expected position). This location of the cleavage site was confirmed by the finding that ADAM17 failed to cleave a peptide in which Ala and Val were reversed. ADAM17 was found to be expressed on NK cells, and stimulation with PMA or *N*-ethyl-maleimide resulted in the shedding of FcγRIIIA/CD16A and CD62L, a specific substrate of ADAM17. Selective inhibition of ADAM17 prevented the shedding of both molecules. Moreover, the shedding of FcγRIIIA/CD16A was strongly correlated with degranulation when a wide range of CD56^{dim} NK cell activating receptors were stimulated, whereas both ADAM17-dependent shedding and internalization were involved in FcγRIIIA/CD16A downmodulation when the latter was engaged. Finally, the shedding of FcγRIIIA/CD16A was restricted to activated cells, suggesting that ADAM17 acts mainly, if not exclusively, in cis. Taken together, our results demonstrated for the first time, to our knowledge, at the molecular level that ADAM17 cleaves the stalk region of FcγRIIIA/CD16A and identified its cleavage site. The shedding of FcγRIIIA/CD16A was at least partially ADAM17 dependent, and it may be considered as a marker of FcγRIIIA/CD16A-independent NK cell activation highly correlated with degranulation. *The Journal of Immunology*, 2014, 192: 000–000.

The low-affinity receptor for the IgG Fc portion expressed on human CD56^{dim} NK cells, monocytes, dendritic cells and rare T cells (1) and involved in Ab-dependent cell cytotoxicity, FcγRIIIA/CD16A, is shed upon NK cell activation

(2, 3). Shedding is a mechanism for irreversible removal of many transmembrane cell-surface molecules. FcγRIIIA/CD16A is shed upon FcγRIIIA/CD16A-dependent activation of CD56^{dim} NK cells by anti-CD16 mAb (3, 4), a condition in which reversible removal of FcγRIIIA/CD16A resulting from internalization has also been described (5), or by the Fc portion of rituximab (4, 6), as well as upon FcγRIIIA/CD16A-independent activation by K562 cells (7) or by phorbol esters such as PMA (2). The identification of the main enzyme involved in the shedding of FcγRIIIA/CD16A represents a critical step toward understanding how FcγRIIIA/CD16A-dependent functions are regulated.

Several members of the a disintegrin and metalloprotease (ADAM) family of membrane-associated proteases are involved in the ectodomain shedding of cell surface proteins (8). ADAM17/TNF-α-converting enzyme, which is responsible for processing TNF-α from its membrane-bound precursor to its soluble circulating form, and ADAM10 are the most characterized members of the ADAM family, having ~50% sequence identity within the catalytic domain (9). Specific substrates exist for each protease: CD62L (L-selectin), for example, is specifically processed by ADAM17 from leukocyte membranes (10, 11), whereas epidermal growth factor is processed exclusively by ADAM10 (12). However, several substrates can be cleaved by both enzymes, and the specific protease involved is dictated by the activating stimulus. The enzymatic activity of ADAM17 and ADAM10 is rapidly induced upon neutrophil activation (13). Several corroborating studies have shown that ADAM17 can shed FcγRIIIB/CD16B on stimulated neutrophils (14–17). The role of ADAM10 is less clear: selective inhibitors of ADAM10 do not impair the shedding of FcγRIIIB/CD16B (17), whereas Guo et al. (16) reported that

^{*}Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7292, Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer, Université François-Rabelais de Tours, 37032 Tours Cedex, France; [†]Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, Laboratoire d'Immunologie, 37044 Tours Cedex, France; [‡]INSERM, U1062, Nutrition, Obésité et Risques Thrombotiques, Faculté de Médecine, F-13385 Marseille, France; [§]INSERM, U1100, Pathologies Respiratoires: Protéolyse et Aérosolthérapie, Université François-Rabelais de Tours, 37032 Tours Cedex, France; and [¶]INSERM, U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, 44007 Nantes Cedex, France

¹L.L. and N.C.-J. contributed equally to this work.

Received for publication April 18, 2013. Accepted for publication November 5, 2013.

This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer, the Agence Nationale pour la Recherche (AO 2005 "Emergence et Maturation de Projet de Biotechnologie à Fort Potentiel de Valorisation" and Programme "Investissements d'Avenir; LabEx MAbImprove: ANR-10-LABX-53"), the Institut National du Cancer, the Association Cancen, and the Fondation Langlois. L.L. is supported by the Région Centre.

Address correspondence and reprint requests to Prof. Gilles Thibault, Centre National de la Recherche Scientifique and Université François-Rabelais de Tours, 10 Boulevard Tonnelle, 37032 Tours Cedex, France. E-mail address: gilles.thibault@univ-tours.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: ADAM, a disintegrin and metalloprotease; AR, activating receptor; CaI, calcium ionophore; DABCYL, 4-(4-dimethylaminophenyl) diazenylbenzoic acid; DNAM, DNAX accessory molecule-1; EDANS, 5-((2-aminoethyl) amino)naphthalene-1-sulfonic acid; FCM, flow cytometry; HNE, human neutrophil elastase; m/z, mass-to-charge ratio; NEM, *N*-ethyl-maleimide; rh, recombinant human; TIMP3, tissue inhibitor of metalloproteinase 3; TMI-2, (2R, 3S)-2-[[[4-(2-butyloxy) phenyl]sulfonyl]amino]-N,3-dihydroxybutanamide; WT, wild-type.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/\$16.00

ADAM17 and ADAM10 are the main sheddases of Fc γ RIIIB/CD16B when cells are stimulated by PMA and calcium ionophore (CaI), respectively. The shedding of Fc γ RIIIA/CD16A on NK cells induced by Fc γ RIIIA/CD16A cross linking or by stimulation of NK cells with IL-12 and IL-18 has recently been shown to be greatly attenuated in the presence of ADAM17 inhibitor (18). It is of note that Fc γ RIIIB/CD16B and Fc γ RIIIA/CD16A are encoded by two highly similar genes (19). However, Fc γ RIIIA/CD16A is a membrane-spanning protein (19, 20), whereas Fc γ RIIIB/CD16B is linked to the plasma membrane via a GPI anchor (21, 22). The sequences from Thr¹⁹¹ to Ser²⁰¹ of Fc γ RIIIA/CD16A and Fc γ RIIIB/CD16B are identical and contain the putative cleavage site of Fc γ RIIIB/CD16B (23) (Fig. 1).

Given the sequence homology of Fc γ RIIIA/CD16A and Fc γ RIIIB/CD16B, we were interested to study the roles of ADAM10 and ADAM17 in the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A and to identify the putative cleavage site. Our second aim was to study the relationship between the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A and the functional responses of CD56^{dim} NK cells upon Fc γ RIIIA/CD16A-independent stimulation.

Materials and Methods

Cells

PBMCs, NK cells, JY cells, NKL cells, and CD16 γ -transduced T cells were isolated and/or cultured as previously described (1, 4, 24, 25).

Abs

The following mAbs were used: FITC- or PC7-conjugated anti-CD16 (clone 3G8), PE-conjugated anti-CD62L (clone DREG56), PC7-conjugated anti-CD3 (clone UCHT1), PE-conjugated anti-CD19 (clone J3-119), PC5-conjugated anti-CD56 (clone N901), and isotype control (Beckman Coulter); PC5-conjugated anti-CD107a (clone H4A3) and isotype control (BD Biosciences); unconjugated anti-CD16 clone Dj130c from Santa Cruz Biotechnology; Abs targeting NKG2D/CD314 (clone 1D11),

NKp30/CD335 (clone 4D12), NKp46/CD335 (clone 9E2), 2B4/CD244 (clone 2-69), and DNAX accessory molecule-1 (DNAM)/CD226 (clone DX11) and isotype control from BD Biosciences; and FITC-conjugated anti-ADAM17 (clone 111633) and its isotype control from R&D Systems. Unconjugated anti-ADAM17 rabbit polyclonal Ab was from France Biochem, HRP-conjugated anti-rabbit Ab from Cell Signaling Technology, and HRP-conjugated anti-murine IgG from GE Healthcare.

Reagents and substrates

Recombinant human (rh)Fc γ RIIIA/CD16A tagged with a polyhistidine at the C-terminal, rhADAM17, and rhADAM10 were purchased from R&D Systems. The sp. act. of rhADAM17 and rhADAM10 was verified using fluorogenic peptide substrates III and IX, respectively (R&D Systems). PMA and Cal (A23187; Calimycin) were purchased from Sigma-Aldrich. *N*-ethyl-maleimide (NEM) was purchased from Calbiochem, human neutrophil elastase (HNE) from Biocentrum, and trypsin from Euromedex. Fluorogenic substrate 4-(4-dimethylaminophenyl) diazenylbenzoic acid (DABCYL)-Thr-Gln-Gly-Leu-Ala-Val-Ser-Thr-Ile-Ser-Ser-Glu 5-((2-aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid (EDANS)-NH₂ and DABCYL-Thr-Gln-Gly-Leu-Val-Ala-Ser-Thr-Ile-Ser-Ser-Glu(EDANS)-NH₂ were custom synthesized by Gencust Europe.

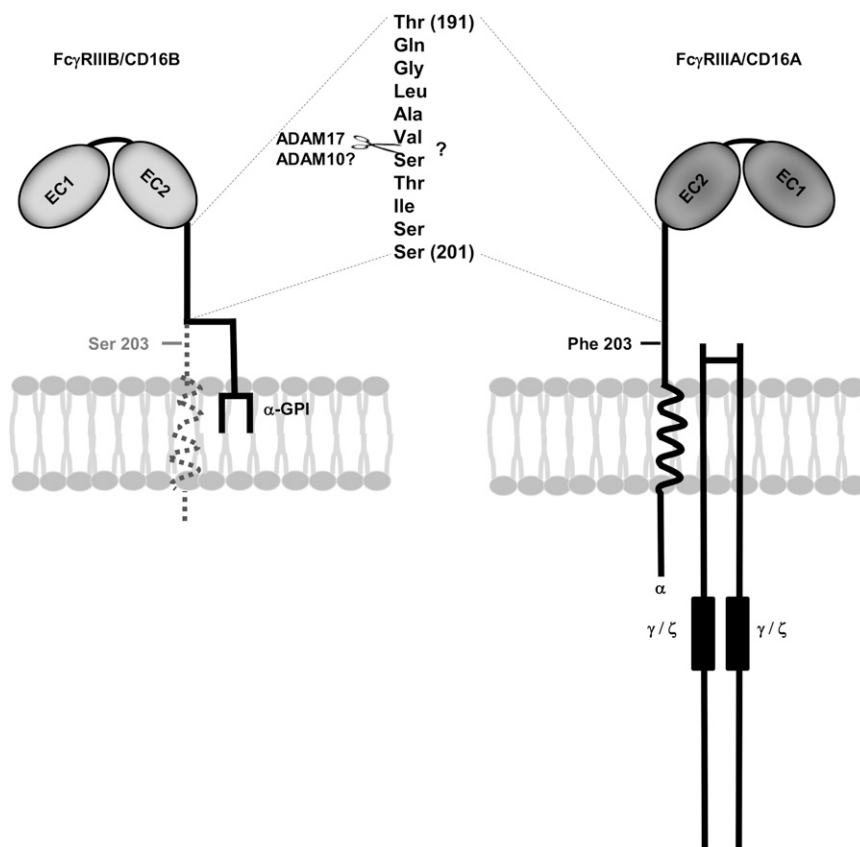
ELISA assay

Soluble rhFc γ RIIIA/CD16A protein (0.4 nM) was incubated for 2 h at 37°C in the absence or presence of 0.3 μ M HNE or with rhADAM10 or rhADAM17 (0.6–20 nM) in ADAM reaction buffer (25 mM Tris [pH 7.4] containing 2.5 μ M ZnCl₂ and 0.005% Brij-35 [v/v]). Each sample (100 μ l) was applied to the Nickel chelate plate (Fisher Scientific) for 2 h with gentle agitation at room temperature. The uncleaved rhFc γ RIIIA/CD16A was detected after incubation for 1 h with anti-CD16 clone Dj130c (1 μ g/ml) and then HRP-conjugated anti-murine IgG diluted to 1/5000. Absorbance at 492 and 620 nm was measured with an iEMS reader MF spectrometer (Labsystems).

Fluorogenic assay

The assay was performed with HNE (3 μ M), trypsin (3 μ M), rhADAM17, or rhADAM10 (10 μ g/ml) in 25 μ M Tris (pH 9), containing 2.5 mM ZnCl₂ and 0.005% Brij-35 (v/v). Cleavage of the fluorogenic substrate (5 μ M) was measured at Ex340/Em490nm using a SPECTRAMax

FIGURE 1. Schematic representation of Fc γ RIIIB/CD16B and Fc γ RIIIA/CD16A. Fc γ RIIIB/CD16B (*left panel*) is linked to the plasma membrane via a GPI anchor, whereas Fc γ RIIIA/CD16A (*right panel*) is a membrane-spanning protein. The residue at position 203 (Phe and Ser for Fc γ RIIIA/CD16A and Fc γ RIIIB/CD16B, respectively) in the proform of the molecules is critical for this alternative membrane form (48). The proform of Fc γ RIIIB/CD16B (with Ser²⁰³) expressed as a membrane-spanning protein in the endoplasmic reticulum before GPI anchoring is shown as a gray dotted line. The glypiation site of the mature form of Fc γ RIIIB/CD16B is likely to be the Ser at position 201 according to the prediction of the ω -site (cleavage site) in the proprotein sequence (49–51). The sequence from Thr¹⁹¹ to Ser²⁰¹ of the stalk regions of Fc γ RIIIB/CD16B and Fc γ RIIIA/CD16A is indicated (*middle panel*). The location of the cleavage site (between Val¹⁹⁶ and Ser¹⁹⁷) of Fc γ RIIIB/CD16B is putative (23). Black boxes represent ITAMs.



Gemini XS spectrofluorometer and SoftMax Pro 5.3 software (Molecular Devices).

MALDI-TOF-mass spectrometry analysis

Spectra were carried out on an UltraFlex I mass spectrometer (Bruker Daltonics). Samples were diluted 10-fold in a solution of 4-hydroxy- α -cyano-cinnamic acid saturated in a solution of 33.3% acetonitrile, 66.6% water, and 0.1% trifluoroacetic acid. Matrix-sample solutions were spotted onto a gold-plated sample probe using the ultrathin layer method (26, 27). Spectra were acquired in the reflectron negative mode (1000–1200 laser shots) in the 500–3500 mass-to-charge ratio (m/z) range. Calibration of the instrument was performed externally using a neighboring spot with a pepmix calibration kit consisting of angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin, adrenocorticotrophic hormones (clips 1–17 and clips 18–39), and somatostatin 28 (Bruker Daltonics). MALDI-TOF-mass spectrometry spectra were processed using FlexAnalysis 3.3 software from Bruker Daltonics.

Western blotting

Cell extracts were prepared in Nonidet P-40 150 mM NaCl buffer (30 min, 4°C), centrifuged at $15,000 \times g$ for 15 min at 4°C, and 50 μ g protein extracts were loaded on SDS-PAGE under nonreducing conditions and then transferred to nitrocellulose membranes. The nitrocellulose sheet was blocked with PBS containing 5% nonfat dried milk and 0.05% Tween 20 for 1 h at room temperature and then incubated overnight at 4°C with anti-ADAM17 rabbit polyclonal Ab (1/250). After three washes, the membrane was incubated for 1 h at room temperature with HRP-conjugated anti-rabbit Ab (1/5000), washed three times, and reacted for 15 min with an ECL Western blotting system (GE Healthcare) according to the manufacturer's protocol.

Flow cytometry analysis

ADAM17 expression was analyzed on PBL after staining with 10 μ l anti-CD3, anti-CD19, anti-CD56, and FITC-conjugated anti-ADAM17 mAb or FITC-conjugated isotype control for 30 min at 4°C. CD16 down-modulation and CD107 expression on NK cells were analyzed as previously described (4). CD16 and CD62L comodulation on stimulated NK cells and/or CD16/ γ -transduced T cells was analyzed after staining with 10 μ l anti-CD16 and anti-CD62L for 30 min at 4°C. All flow cytometry (FCM) analyses were performed with a minimum of 5000 events using an EPICS XL or a Gallios flow Cytometer as described in Dall'Ozzo et al. (25) and Kaluza version 1.2 (Beckman Coulter).

Activation of NK cells by PMA/Cal or NEM

NK cells (1×10^5 /ml) were laid down on P96 culture plates (BD Biosciences) and then incubated at 37°C in 5% CO₂ humidified air, with indicated concentrations of PMA and/or Cal for 4 h or in the presence of indicated concentrations of NEM for indicated times. In some experiments, cells were preincubated for 1 h in the presence of indicated concentrations of specific pharmacological inhibitor [(2R, 3S)-2-([4-(2-butyloxy)phenyl]sulfonyl)amino]-N,3-dihydroxybutanamide (TMI-2)] or physiological inhibitor (tissue inhibitor of metalloproteinase 3 [TIMP-3]) of ADAM17 before stimulation with 1 ng/ml PMA. TIMP-3 was purchased from R&D Systems, and TMI-2 was prepared by Dr. J. M. Brunel (Laboratory of Integrative Structural & Chemical Biology, Marseille, France) according to a previously reported procedure (28).

Activation of NK cells and CD16/ γ -transduced T cells by plate-bound mAbs

Nunc Maxisorp 96-well culture plates (Fisher Scientific) were sensitized overnight at 4°C as previously described (4) with mAbs targeting CD16, CD3, NKG2D/CD314, NKp30/CD335, NKp46/CD335, 2B4/CD244, and/or DNAM/CD226. After washing three times with PBS 0.05% Tween solution, plates were saturated for 30 min with 1% BSA (Sigma-Aldrich) and then washed twice with PBS 0.05% Tween. Freshly isolated NK cells preincubated with TMI-2 or TIMP-3 and/or CD16/ γ -transduced T cells (1×10^5 /ml) or not preincubated were laid down on sensitized wells of culture plates and incubated for 4 h at 37°C with 5% CO₂ humidified air in the absence or presence of anti-CD107a.

Results

ADAM17 cleaved the stalk region of Fc γ RIIIA/CD16A between Ala¹⁹⁵ and Val¹⁹⁶ residues

We first investigated the ability of ADAM10 and ADAM17 to cleave Fc γ RIIIA/CD16A (Fig. 1). Soluble rhFc γ RIIIA/CD16A

was incubated in the presence of increasing concentrations of rhADAM17 or rhADAM10 or in the presence of HNE used as positive control. Each sample was then deposited on a nickel plate to capture polyhistidine-tagged rhFc γ RIIIA/CD16A. Uncleaved rhFc γ RIIIA/CD16A protein was detected by ELISA using the anti-CD16 mAb Dj130c. Detection of rhFc γ RIIIA/CD16A was reduced by 67.5% after incubation with HNE, indicating effective cleavage of rhFc γ RIIIA/CD16A (Fig. 2A). rhADAM17 was also effective and cleaved rhFc γ RIIIA/CD16A in a dose-dependent manner, whereas no cleavage was detected after incubation with a high concentration of rhADAM10.

We then used a fluorogenic peptide, DABCYL–Thr–Gln–Gly–Leu–Ala–Val–Ser–Thr–Ile–Ser–Ser–Glu(EDANS)–NH₂ (designed with a fluorochrome and a quencher at the N- and C-terminal ends of the peptide, respectively), for which the sequence encompasses aa 191–201 of Fc γ RIIIA/CD16A and Fc γ RIIIB/CD16B. Fluorescence was measured after incubation of the peptide in the presence of HNE, trypsin (used as a negative control), rhADAM17, or rhADAM10. HNE effectively cleaved the peptide, whereas trypsin had no significant detectable effect (Fig. 2B). rhADAM17 induced substantial cleavage of the peptide after 10 min of exposure, reaching a plateau similar to that of HNE after 45 min. By contrast, no cleavage was observed in the presence of rhADAM10. These results are therefore in accordance with those obtained with the complete ectodomain of Fc γ RIIIA/CD16A (Fig. 2A) and demonstrate the ability of rhADAM17 to cleave the stalk regions of Fc γ RIIIA/CD16A and Fc γ RIIIB/CD16B.

Analyses of the cleavage products by MALDI-TOF-mass spectrometry are shown in Fig. 2C. Two peaks, one corresponding to the intact peptide DABCYL–Thr–Gln–Gly–Leu–Ala–Val–Ser–Thr–Ile–Ser–Ser–Glu(EDANS)–NH₂ (m/z 1688.763) and one corresponding to a peptide containing degraded DABCYL (m/z 1556.696), were detected in the absence of the enzyme (Fig. 2C, *top panel*). A single peak was observed in the sample containing only rhADAM17 (Fig. 2C, *middle panel*). Two additional peaks were identified in the cleavage products (Fig. 2C, *bottom panel*) (i.e., DABCYL–Thr–Gln–Gly–Leu–Ala [m/z 738.274] and Val–Ser–Thr–Ile–Ser–Ser–Glu(EDANS)–NH₂ [m/z 967.435]), indicating that ADAM17 cleaves the peptide substrate between Ala¹⁹⁵ and Val¹⁹⁶ residues.

An Ala residue at P1 position immediately upstream of the cleavage site favors the catalytic action of ADAM17, whereas a Val residue at this position is detrimental (29). We therefore designed a second fluorogenic peptide in which Ala and Val were reversed. As shown in Fig. 2D, the fluorescence observed after incubation of rhADAM17 with the peptide containing the reverse sequence was dramatically decreased compared with that observed with the wild-type (WT) sequence, confirming the specificity of the cleavage site in the peptide corresponding to the stalk regions of Fc γ RIIIA/CD16A and Fc γ RIIIB/CD16B. We concluded that rhADAM17 cleaves Fc γ RIIIA/CD16A and probably Fc γ RIIIB/CD16B between the Ala¹⁹⁵ and Val¹⁹⁶ amino acids.

ADAM17 was present on the surface of NK cells and mediated the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A

We then investigated the presence of ADAM17 on NK cells. First, cell extracts from PBMC (used as a positive control), from purified human NK cells, from the JY lymphoblastoid cell line and the NK cell line were analyzed by Western blotting. We used a rabbit polyclonal Ab against human ADAM17, allowing simultaneous detection of several bands corresponding to the catalytic form (80 kDa), the precursor (proform 110 kDa), and glycosylated ADAM17 (130 kDa). The results showed the presence of an 80-kDa band (Fig. 3A *bottom*, arrow) and a 110-kDa band (Fig. 3A *top*, arrow) in all cell extracts. However, the mature

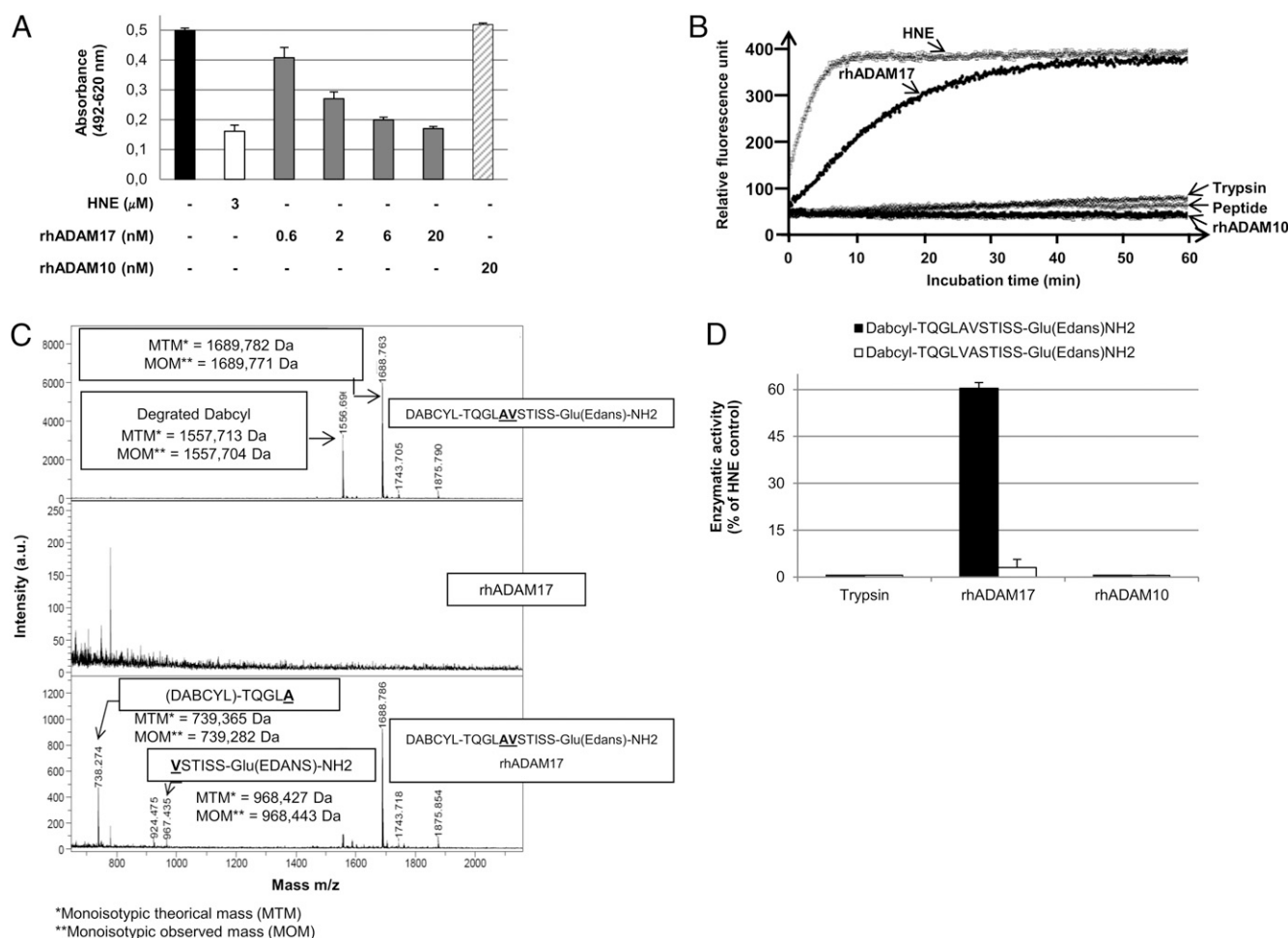


FIGURE 2. The stalk region of Fc γ RIIIA/CD16A cleaved by ADAM17 between Ala¹⁹⁵ and Val¹⁹⁶. **(A)** Uncleaved recombinant human Fc γ RIIIA/CD16A was detected by ELISA using anti-CD16 mAb Dj130c, which recognizes an epitope located in the EC1 domain of Fc γ RIIIA/CD16A (4) after incubation in the absence (black bar) or in the presence of HNE used as positive control (white bar), or in the presence of rhADAM10 (gray hatched bar) or rhADAM17 (gray bars). The activity of rhADAM10 and rhADAM17 was checked using commercial fluorogenic peptide (L. Lajoie, unpublished observations). This experiment was repeated twice, and the results from one representative experiment are shown (as mean $\pm$ SD of triplicate). **(B)** Hydrolysis of the fluorogenic peptide DABCYL-Thr-Gln-Gly-Leu-Ala-Val-Ser-Thr-Ile-Ser-Ser-Glu(EDANS)-NH₂, corresponding to the stalk regions of Fc γ RIIIB/CD16B and Fc γ RIIIA/CD16A, was analyzed by fluorescence after incubation in the absence or presence of HNE, trypsin used as a negative control, rhADAM17, or rhADAM10. This experiment was repeated four times, and one representative experiment is shown. **(C)** MALDI-TOF analysis of the fluorogenic peptide DABCYL-Thr-Gln-Gly-Leu-Ala-Val-Ser-Thr-Ile-Ser-Ser-Glu(EDANS)-NH₂ (top panel) (each amino acid residue is indicated by single letter code), rhADAM17 (middle panel), and the cleavage products obtained after incubation with rhADAM17 (bottom panel). **(D)** Hydrolysis of the fluorogenic WT peptide DABCYL-Thr-Gln-Gly-Leu-Ala-Val-Ser-Thr-Ile-Ser-Ser-Glu(EDANS)-NH₂ (black bars) and of the peptide DABCYL-Thr-Gln-Gly-Leu-Ala-Val-Ser-Thr-Ile-Ser-Ser-Glu(EDANS)-NH₂ (white bars) was analyzed by fluorescence after incubation in the absence or presence of HNE, rhADAM17, or rhADAM10. This experiment was repeated twice, and one representative experiment is shown.

form of ADAM17 was detected at higher intensity in NK cell extracts than in PBMCs, the JY cell line, or the NKL cell line. Membrane expression of ADAM17 on PBL and purified NK cells was then studied by FCM. As shown in Fig. 3B, ADAM17 was expressed by all PBL populations. Expression was relatively weak, although the staining of CD19⁺ cells was slightly higher than that of CD3⁺CD56⁺ cells and CD3⁺ cells. ADAM17 expression was detected on almost all purified NK cells.

The shedding of Fc γ RIIIB/CD16B induced by CaI and PMA on neutrophils is mainly ADAM10 and ADAM17 dependent, respectively (16). We therefore evaluated the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A on NK cells under stimulation with CaI and/or PMA. As shown in Fig. 4A, stimulation with PMA induced dose-dependent downmodulation of CD16. Moreover, this effect was not modified in the presence of CaI, whereas CaI used alone was ineffective.

CD62L (L-selectin), a known specific substrate of ADAM17 (10, 11), is expressed on a fraction of NK cells (30). We therefore

studied the comodulation of CD16 and CD62L after stimulation of NK cells with NEM, a direct activator of ADAM (31), and after stimulation with PMA. First, stimulation with NEM resulted in dose- and time-dependent downmodulation of CD62L and CD16 (Fig. 4B). Downmodulation of both CD16 and CD62L was detected after 5 to 10 min and was complete after 30 to 45 min, suggesting that the ADAM(s) responsible for the cleavage is (are) expressed on the membrane of NK cells. We did not observe CD62L expression on cells that have downmodulated CD16 (CD62L⁺CD16^{low}) after NEM stimulation, showing that downmodulation of CD16 and CD62L occurred simultaneously and suggesting that the same ADAM was responsible for the shedding of both molecules. This was confirmed when NK cells were stimulated with PMA (Fig. 4C): CD16 and CD62L were simultaneously and dramatically downregulated. Preincubation of NK cells prior to PMA stimulation with increasing concentrations of TIMP-3 or TMI-2 [physiologic and selective pharmacologic

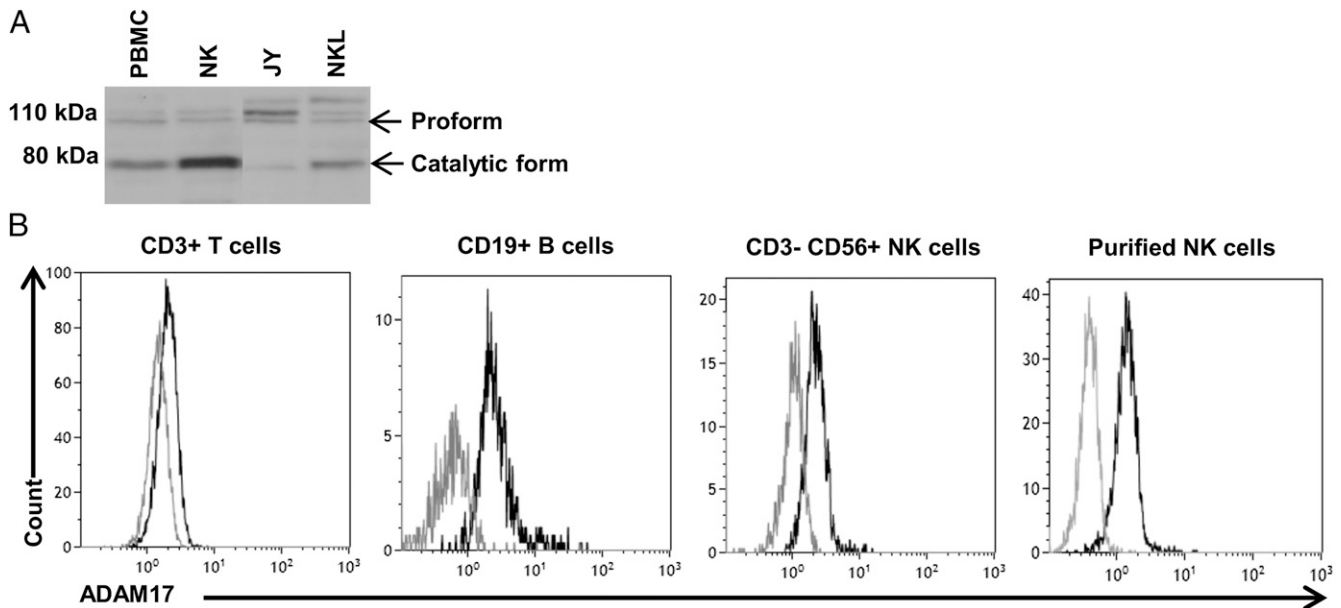


FIGURE 3. ADAM17 expressed on lymphoid cells. **(A)** The proform (110 kDa, *top*, arrow) and the catalytic form (80 kDa, *bottom*, arrow) of ADAM17 were detected by Western blotting from protein extracts of PBMCs, purified NK cells, and JY and NKL cell lines using a rabbit polyclonal anti-ADAM17 Ab. **(B)** PBL stained with anti-CD3, anti-CD19, anti-CD56 (to identify T cells, B cells and NK cells, respectively), and purified NK cells were stained with FITC-conjugated anti-ADAM17 mAb (black histograms) or with FITC-conjugated isotype control (gray histograms) and analyzed by FCM. This experiment was repeated three times, and one representative experiment is shown.

inhibitors of ADAM17, respectively (32, 33)] led to dose-dependent inhibition of both CD62L and CD16 downmodulation. Our results supported the conclusion that ADAM17 mediates the shedding of FcγRIIIA/CD16A on stimulated NK cells.

ADAM17-dependent shedding of FcγRIIIA/CD16A induced by FcγRIIIA-independent NK cell activation was highly correlated with degranulation

The FcγRIIIA/CD16A engagement by anti-CD16 or rituximab led to simultaneous CD16 downmodulation and degranulation (4). Moreover, CD16 downmodulation has been observed following interaction between NK cells and K562 target cells, which is independent of FcγRIIIA/CD16A engagement (7). In addition to FcγRIIIA/CD16A engagement, the triggering of NK cell functions requires a combination of activator signals mediated by activating receptors (ARs) such as NKG2D, NKp30, NKp46, 2B4, and DNAM (34). We therefore studied degranulation and CD16 downmodulation in response to stimulation of NK cell ARs. NK cells were incubated in plates sensitized by combinations of one to five mAbs targeting NKG2D, NKp30, NKp46, 2B4, and DNAM. The coengagement of at least two or more ARs was required to induce degranulation (Fig. 5A, *top panel*), CD16 downmodulation (Fig. 5A, *bottom panel*), or IFN-γ production (Supplemental Fig. 1A) in a significant proportion of NK cells. The percentage of degranulating cells depended on the combination used to stimulate the cells, tending to increase with the number of ARs simultaneously engaged (Fig. 5A, *top panel*). Using the 31 possible combinations of 1–5 mAbs, we obtained a wide range of responses. Importantly, we observed that the profiles of CD16 downmodulation and CD107a expression according to the stimulation combination used were very similar (compare Fig. 5A, *top* and *bottom panels*), although the percentages of cells downmodulating CD16 were always substantially higher than the percentages of CD107a⁺ cells. The calculated coefficient of correlation was therefore very high ($R^2 = 0.97$), whereas a weaker correlation was also observed between CD16 downmodulation and IFN-γ production (Supplemental Fig. 1B). It is unlikely that this weaker correlation resulted

from the fact that CD56^{bright} cells, which do not express CD16, might represent a significant proportion of IFN-γ-producing cells. Indeed, IFN-γ⁺ NK cells observed after stimulation by the effective combination of mAbs targeting NKG2D, NKp30, NKp46, and 2B4 were almost totally confined to CD56^{dim} NK cells (Supplemental Fig. 1C). Finally, we studied the downmodulation of CD16 and CD62L induced by the combination of mAbs targeting NKG2D, NKp30, NKp46, and 2B4. This stimulation combination led to downmodulation of both molecules (Fig. 5B). Preincubation of NK cells with TIMP-3 or TMI-2 led to dose-dependent inhibition of downmodulation of both molecules. We concluded that the ADAM17-dependent shedding of FcγRIIIA/CD16A occurred after FcγRIIIA/CD16A-independent stimulation of NK cells and was strongly correlated with degranulation. It is of note that the FcγRIIIA/CD16A engagement by plate-bound anti-CD16 3G8 led to upregulation of CD107a on $17.7 \pm 3.4\%$ of NK cells and to downregulation of FcγRIIIA/CD16A on $95.4 \pm 3.9\%$ ($n = 6$) (i.e., a percentage similar to and substantially higher than that obtained when NK cells were stimulated by the combination of mAbs targeting NKG2D, NKp30, NKp46, and 2B4) (Fig. 5A). Thus, CD16 downmodulation was weakly correlated with upregulation of CD107a when cells were incubated with 3G8 compared with experiments in which other stimuli were used to activate NK cells. We cannot exclude the possibility that the detection of CD16 by fluorescent mAb might be hampered by potential epitope interference (due to cross linking or conformational change) (18) or by a putative masking effect due to detachment of the unconjugated stimulating anti-CD16 from the microplate (4). However, this hypothesis is unlikely because: 1) we observed simultaneous and dramatic downmodulation of CD62L (see below) when NK cells were stimulated by plate-bound 3G8; and 2) we found that ADAM17 inhibitors substantially inhibited the downmodulation of FcγRIIIA induced in this condition (Supplemental Fig. 2A). Another explanation might be that FcγRIIIA/CD16A may be internalized when it is engaged. An internalization method (35) therefore tested in which the cells were incubated with soluble Alexa 488-labeled 3G8, in the presence of an anti-Alexa 488

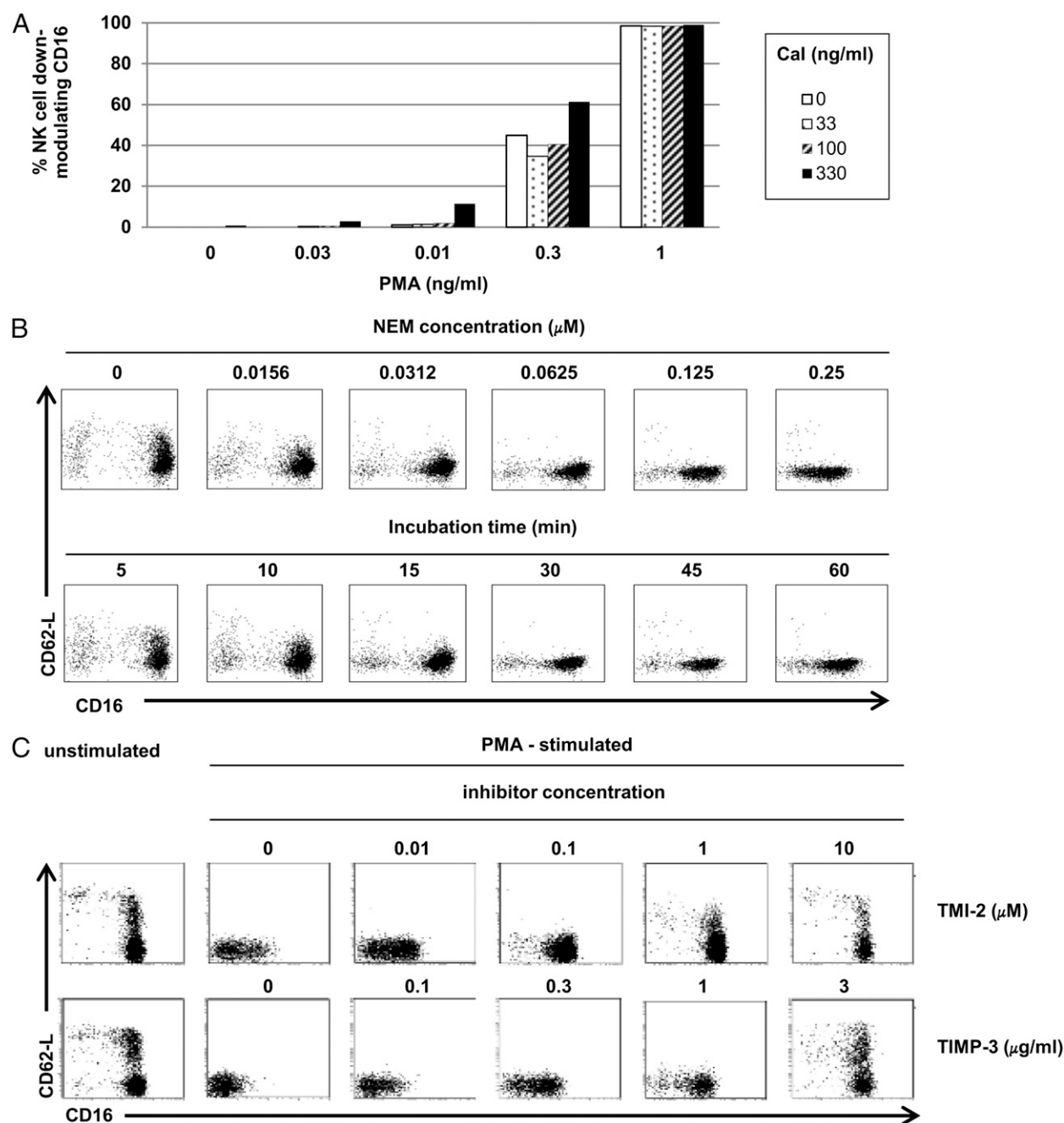


FIGURE 4. ADAM17 involved in the shedding of FcγRIIIA/CD16A. **(A)** NK cells were stained with anti-CD16 mAb after incubation with indicated concentrations of PMA and/or Cal and analyzed by FCM. Results are expressed as the percentage of NK cells downmodulating CD16. This experiment was repeated four times, and one representative experiment is shown. NK cells were stained with anti-CD16 and anti-CD62L mAbs after incubation for 1 h in the absence or presence of indicated concentrations of NEM (*top panels*) **(B)** or for the indicated times in the presence of 0.125 μM of NEM (*bottom panels*) **(C)** or after initial incubation in the absence or presence of indicated concentrations of specific pharmacological inhibitor (TMI-2) or physiological inhibitor (TIMP-3) of ADAM17 followed by a second incubation in the presence of PMA and analyzed by FCM. Each experiment was repeated at least three times, and one representative experiment is shown.

Ab, which quenches fluorescence on the cell surface but not from internalized molecules (Supplemental Fig. 2B). Using this approach, we found that FcγRIIIA/CD16A downmodulation induced by soluble 3G8 was partially due to internalization. However, dramatic downmodulation of CD62L on CD56^{dim} NK cells stimulated by soluble 3G8 was observed at the same time, showing that ADAM17-dependent shedding was induced in this condition (Supplemental Fig. 2C, *right panel*). We concluded that ADAM17-dependent shedding and internalization may both be involved in the loss of CD16 when the latter is engaged and that the relative

contribution of each mechanism might depend on the conditions of engagement (for instance, immobilized versus soluble anti-CD16). By contrast, ADAM17-dependent shedding was the main, if not the exclusive, mechanism after FcγRIIIA/CD16A-independent stimulation of NK cells and strongly correlated with degranulation in this situation.

Shedding of FcγRIIIA/CD16A was restricted to activated cells

Given that the percentages of cells downmodulating CD16 were substantially higher than the percentages of degranulating cells, we

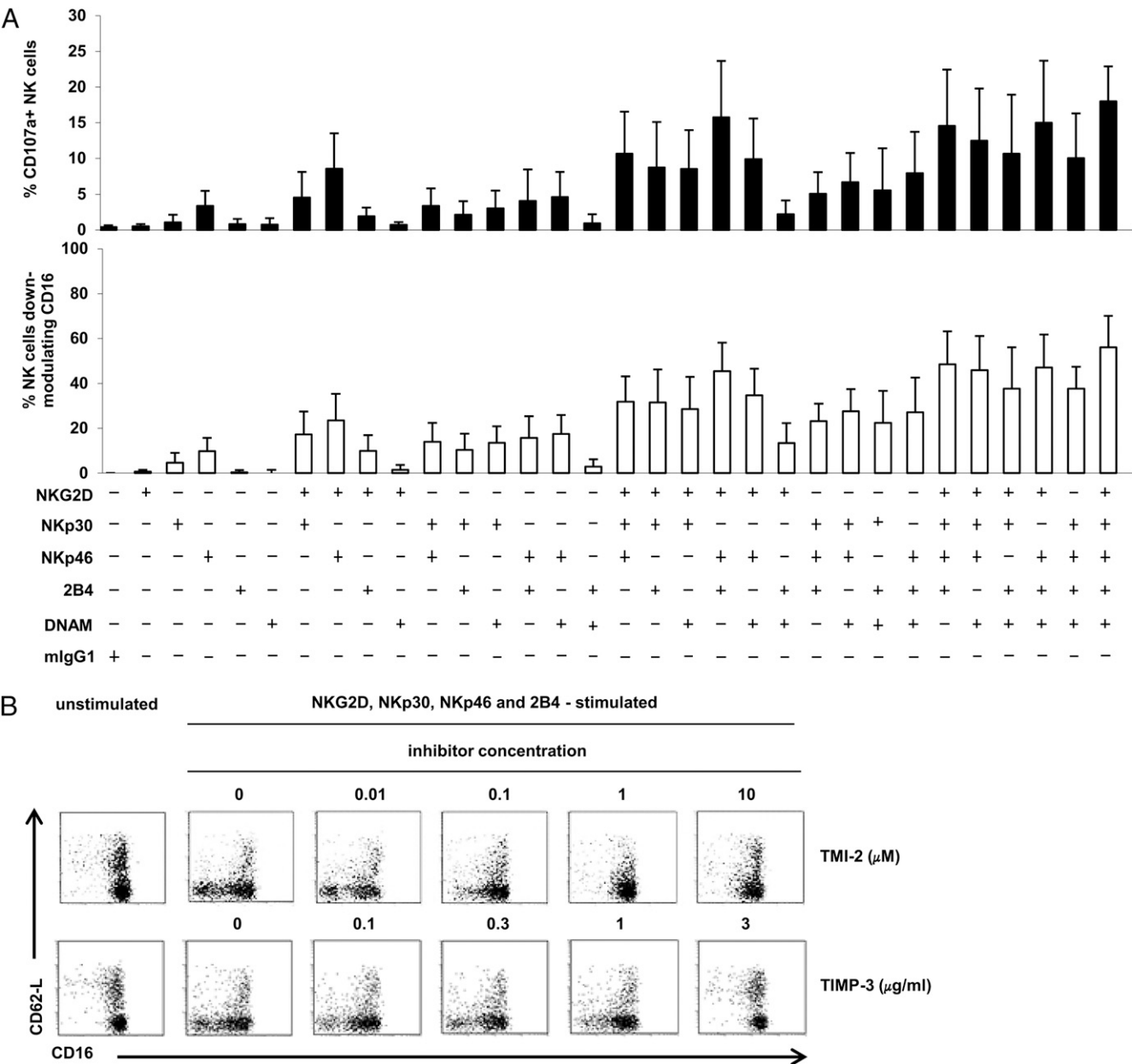


FIGURE 5. Shedding of Fc γ RIIIA/CD16A strongly correlated with degranulation after Fc γ RIIIA/CD16A-independent stimulation of NK cells. **(A)** Freshly isolated NK cells were incubated in the presence of fluorescent anti-CD107a mAb in plates sensitized with a combination of one to five mAbs targeting NKG2D, NKp30, NKp46, 2B4, and DNAM. They were then stained with anti-CD16 mAb and analyzed by FCM. Each bar represents the percentage of CD107⁺ NK cells (*top panel*) or of NK cells downmodulating CD16 (*bottom panel*) according to the mAb combination used (results are the mean $\pm$ SD of six separate experiments using NK cells from six different donors). **(B)** NK cells were treated as described in Fig. 4C except that the second incubation was performed on plates sensitized with a combination of mAbs targeting NKG2D, NKp30, NKp46, and 2B4.

wondered whether ADAM17 expressed on an activated cell could mediate the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A on the cell surface of a neighboring cell (i.e., *in trans*). Expression of CD62L and CD16 was therefore evaluated on CD16 γ -transduced T cells (36) and NK cells. As shown in Fig. 6 (*top panels*), stimulation of NK cells with anti-CD3 mAb did not modify CD16 or CD62L expression, whereas stimulation with mAbs targeting NKG2D, NKp30, NKp44, and 2B4 induced the shedding of both molecules. In contrast, stimulation of CD16 γ -transduced T cells led to the opposite result: CD3 engagement induced substantial shedding of Fc γ RIIIA/CD16A, whereas coengagement of NKG2D, NKp30, NKp44, and 2B4 was ineffective (Fig. 6, *middle panel*). When NK cells and CD16 γ -transduced T cells were mixed and stimulated in these conditions, Fc γ RIIIA/CD16A shedding was restricted to

T cells after CD3 stimulation (Fig. 6, *bottom middle panel*) and to NK cells after NKG2D, NKp30, NKp44, and 2B4 stimulation (Fig. 6, *bottom right panel*). These results demonstrated that the Fc γ RIIIA/CD16A shedding was restricted to appropriately stimulated cells and suggest that this is likely to occur mainly, if not exclusively, *in cis*.

Discussion

This study was undertaken to investigate the roles of ADAM10 and ADAM17 in the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A. We found that only the latter was able to cleave Fc γ RIIIA/CD16A, and we determined the cleavage site, which was located in the stalk region between Ala¹⁹⁵ and Val¹⁹⁶ (i.e., 1 aa upstream of the expected position). We also demonstrated that the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A on

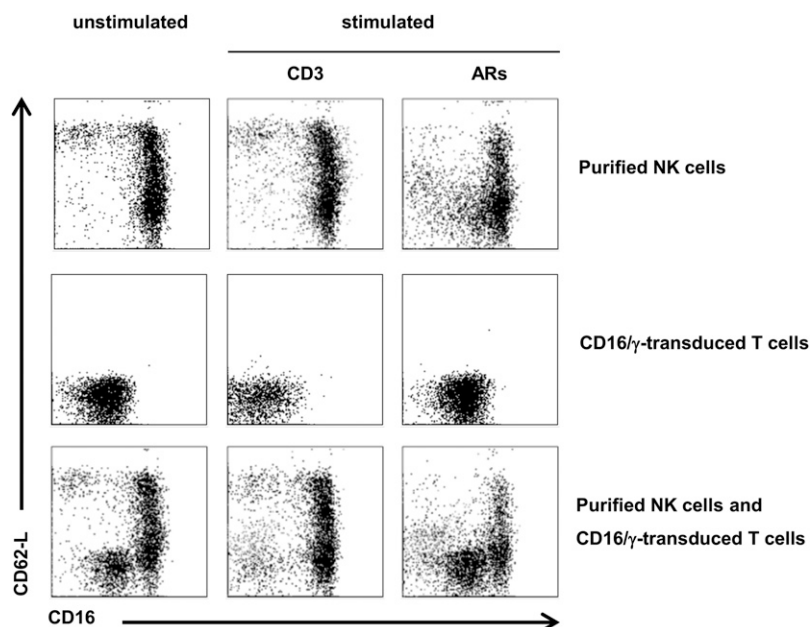
NK cells was at least partially mediated by ADAM17. Moreover, we showed that the ADAM17-dependent shedding of Fc γ RIIIA/CD16A on CD56^{dim} NK cells was strongly correlated with degranulation when a wide range of NK cell ARs were stimulated. ADAM17-dependent shedding of Fc γ RIIIA/CD16A was the main, if not the exclusive, mechanism of Fc γ RIIIA modulation after Fc γ RIIIA/CD16A-independent stimulation of NK cell, whereas both ADAM17-dependent shedding and internalization may be involved after Fc γ RIIIA/CD16A-dependent stimulation. Finally, we provided evidence that the ADAM17-dependent shedding of Fc γ RIIIA/CD16A was restricted to activated cells, suggesting that ADAM17 acts mainly, if not exclusively, in cis. The shedding of Fc γ RIIIA/CD16A may therefore be considered as a marker of Fc γ RIIIA-independent NK cell activation correlated to functional responses.

Using specific inhibitors (14, 15, 17) or overexpressing transfected cells (16, 17), previous studies have reported that Fc γ RIIIB/CD16B may be cleaved by ADAM17 (14–17) and/or ADAM10 (16), depending on the stimulation conditions. The sequences from Thr¹⁹¹ to Ser²⁰¹ of the stalk regions of Fc γ RIIIA/CD16A and Fc γ RIIIB/CD16B are identical and contain the putative cleavage site of the latter, which was reported to be located between Val¹⁹⁶ and Ser¹⁹⁷ (23). We therefore evaluated the ability of recombinant ADAM10 and ADAM17 to cleave the complete ectodomain of Fc γ RIIIA/CD16A or a fluorogenic peptide encompassing the stalk regions of Fc γ RIIIA/CD16A and Fc γ RIIIB/CD16B. We demonstrated that ADAM17 was able to cleave both compounds, whereas ADAM10 was ineffective. To our knowledge, this is the first demonstration at the molecular level that ADAM17 cleaves Fc γ RIIIA/CD16A. Furthermore, MALDI-TOF analysis of the cleavage products revealed that the cleavage site was located between Ala¹⁹⁵ and Val¹⁹⁶, which is 1 aa upstream of the cleavage site suggested on the basis of amino acid sequencing of the C-terminal fragment of the purified soluble plasma Fc γ RIIIB/CD16B (23). However, as stated by the authors, the HPLC chromatogram of the first cycle showing a peak corresponding to Val was difficult to interpret due to high background. By contrast, our MALDI-TOF results were unambiguous. Furthermore, Caescu et al. (29) have already defined the cleavage site selectivity of ADAM17 and ADAM10. They showed that ADAM17 is selective for smaller aliphatic hydrophobic residues at the P1' position (immediately

downstream from the cleavage site), with a Val being the most favored amino acid, whereas ADAM10 can accommodate aromatic amino acids at that position. Moreover, they demonstrated selectivity for small residues such as Ala at P1 (immediately upstream of the cleavage site). They compared their peptide library results to sequences that have been identified as being cleaved by ADAMs and confirmed that an Ala at P1 and a Val at P1' were frequent at ADAM17 cleavage sites (found for instance in the cleavage site of TNF, TGF- α , and Notch). By contrast, a Val at P1 was detrimental for both enzymes. Our MALDI-TOF results were in line with these findings. Moreover, it was expected from the results of Caescu et al. (29) that reversing the Ala and Val in our peptide (resulting in a Val-Ala-Ser sequence rather than an Ala-Val-Ser sequence) would reduce the cleavage if the cleavage site is located between Ala and Val in the WT peptide but not if it is between Val and Ser. Our finding that the Ala-Val permutation completely abolished cleavage by ADAM17 substantiated the former assumption and confirmed the findings obtained by MALDI-TOF. We concluded that ADAM17 (but not ADAM10) cleaves the stalk region of Fc γ RIIIA/CD16A and probably Fc γ RIIIB/CD16B between Ala¹⁹⁵ and Val¹⁹⁶. It is of note that the activation of mouse neutrophils, which resulted in substantial mouse L-selectin downregulation and indicated ADAM17 induction, did not lead to a significant downregulation of mouse CD16 or Fc γ RIV (17). The fact that mouse CD16 and Fc γ RIV are not regulated by ectodomain shedding may be related to the weak amino acid sequence similarity between the stalk region of human CD16 and the corresponding region of mouse CD16 or Fc γ RIV (17).

We clearly detected ADAM17 within cells by Western blotting and also at the cell surface by FCM. It is of note that the membrane expression was relatively weak. Interestingly, ADAM17 was also present on the cell surface of both B cells and T cells, as previously reported (37, 38). In accordance with the membrane expression of ADAM17 on NK cells, the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A was very rapidly induced by stimulation with NEM, which interferes with the bond formed between the cysteine proform and the catalytic zinc ion, thus bypassing the necessity to cleave the proform (39, 40). In addition, our results showed that the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A was induced by stimulation with PMA, a known activator of ADAM17 (31, 41), whereas CaI [which activates

FIGURE 6. Shedding of Fc γ RIIIA/CD16A restricted to activated cells. Purified NK cells (*top panel*), CD16/ γ -transduced T cells (*middle panel*), or both (*bottom panel*) were stained with anti-CD16 and anti-CD62L mAbs after incubation on unsensitized plates (*left panel*), plates sensitized with anti-CD3 mAb (*middle panel*), or with a combination of mAbs targeting NKG2D, NKp30, NKp46, and 2B4 ARs (*right panel*) and analyzed by FCM. This experiment was repeated twice, and one representative experiment is shown.



ADAM10 (42)] was ineffective. Moreover, CD62L, a well-known specific substrate of ADAM17 (10, 11), was comodulated with Fc γ RIIIA/CD16A in a time- and concentration-dependent manner after NEM or PMA stimulation of NK cells. Finally, the shedding of both molecules was inhibited when PMA-stimulated NK cells were preincubated with similar concentrations of ADAM17 inhibitors such as TIMP-3 or the more selective pharmacological inhibitor TMI-2 (33). Our results agree with those recently reported by Romee et al. (18) showing that human NK cells express ADAM17 and that NK cell activation by PMA, cytokine exposure, cross linking of activating receptors, or exposure to K562 target cells resulted in decreased expression of Fc γ RIIIA/CD16A and CD62L, which was blocked by another selective ADAM17 inhibitor (BMS566394). Taken together, these results strongly support the conclusion that ADAM17 is at least partially involved in the shedding of NK cell Fc γ RIIIA/CD16A.

We and others have previously shown that NK cell Fc γ RIIIA is downmodulated after incubation with the anti-CD16 mAb 3G8 (3, 4) or the Fc portion of rituximab (4, 6). Such modulation may result from shedding and/or internalization. Several lines of evidence suggest that the former is the main mechanism when cells are stimulated by immobilized anti-CD16. First, immunocytochemistry and immunoblot analysis revealed little cell-associated CD16 after stimulation of NK cells by 3G8 cross linked with goat anti-mouse-coupled beads or by plate-bound 3G8 (3, 18). Second, incubation of NK cells in the presence of anti-CD16 mAb immobilized on microplates induced a simultaneous dramatic downmodulation of CD62L, a known substrate of ADAM17 (18) (Supplemental Fig. 2C, *left panel*). Third, Fc γ RIIIA downmodulation was strongly inhibited in the presence of 1,10-phenanthroline, an inhibitor of Zn²⁺-dependent metalloprotease (3), and in the presence of different ADAM17 inhibitors (18) (Supplemental Fig. 2A). Finally, the fact that the frequency of NK cells expressing IFN- γ or TNF- α was greater in the presence of the ADAM17 inhibitor BMS566394 after cross linking with CD16 is consistent with the maintenance of CD16 on the cell surface and not with internalization (18). In contrast, when the NK cell responses following engagement of Fc γ RIIIA and other ARs were compared, we found that Fc γ RIIIA downmodulation induced by the former was substantially higher but not degranulation. It may therefore be assumed that internalization is involved in the Fc γ RIIIA/CD16A downmodulation induced by its engagement. Indeed, Cecchetti et al. (5) clearly demonstrated internalization of CD16 on NK cells using confocal microscopy and fluorescent soluble 3G8. CD16 is internalized through a very rapid process (10 min), and newly synthesized CD16 is rapidly re-expressed on the membrane (10 min). In our hands, Fc γ RIIIA downmodulation was not detectable before 1 h of stimulation by plate-bound anti-CD16 mAb or by other stimuli. However, when NK cells were incubated with Alexa 488-labeled 3G8 in the presence of an anti-Alexa 488 Ab, which quenches fluorescence on the cell surface (Supplemental Fig. 2B), we confirmed that internalization actually occurred when Fc γ RIIIA was engaged by soluble 3G8. However, the total fluorescence (membrane and intracellular) was decreased after incubation at 37°C for 3 h, showing that the Alexa 488-labeled 3G8 was partially degraded after internalization and/or that shedding was also effective in this condition (Supplemental Fig. 2B, *right bottom panel*). The fact that CD62L was strongly downregulated in this condition demonstrated that the latter was involved and that it was ADAM17 dependent. These results suggest that both ADAM17-dependent shedding and internalization may be involved in Fc γ RIIIA downmodulation when the latter is engaged by anti-CD16 mAb and that the relative contribution of each mechanism might depend on the conditions of the engage-

ment (for instance, immobilized versus soluble mAb). Finally, activation of NK cells by rituximab-opsonized cells leads to downmodulation of CD16 (18, 43), which correlates with ICAM1 up-regulation (43). Romee et al. (18) have shown that when the human CD20-positive Burkitt's lymphoma cell line Raji precoated with rituximab was incubated with purified NK cells in the presence of the ADAM17 inhibitor BMS566394, modulation of both CD16 and CD62L from NK cells was significantly attenuated, showing that ADAM17-dependent shedding of Fc γ RIIIA is at least partially involved when Fc γ RIIIA is engaged by rituximab-opsonized CD20 positive target cells. Finally, other mechanisms may also be involved when an NK cell interacts directly with a target cell opsonized by an Ab. For instance, it has been shown that both rituximab and CD20 are trogocytosed by NK cells stimulated by rituximab-opsonized cells (44). It is likely that internalization of CD16 is required in this process. The evaluation of the relative involvement of these different mechanisms in the downmodulation observed after Fc γ RIIIA engagement requires further investigations.

Modulation of Fc γ RIIIA/CD16A has also been observed after incubation of NK cells with K562 cells (i.e., independently of Fc γ RIIIA/CD16A engagement) (7). We therefore simultaneously evaluated the degranulation and the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A after coengagement of different NK cell ARs. Using 31 combinations of plate-bound mAbs targeting NKG2D, NKp30, NKp46, 2B4, and DNAM (34), we obtained a wide range of responses. We observed a correlation between IFN- γ production and shedding of Fc γ RIIIA/CD16A (Supplemental Fig. 1B), as previously reported (18). However, in our hands, the shedding of Fc γ RIIIA/CD16A was more highly correlated with degranulation according to the combination used. It has been suggested that the major effector function of CD56^{dim}CD16⁺ NK cells is cytotoxicity, whereas CD56^{bright}CD16^{dim/-} NK cells act mainly by secretion of cytokines. However, we observed that IFN- γ -producing NK cells in response to plate-bound mAbs were CD56^{dim} (Supplemental Fig. 1C). This is in agreement with several studies showing that NK cells producing IFN- γ upon stimulation by K562 (7), Ab-coated target (45), *Drosophila* cells expressing ligands for the NK cell ARs (46) and plate-bound mAbs against ARs (47) belong to the CD56^{dim} subset. In contrast, NK cells that readily respond to monokines such as IL-12 or IL-15 belong to the CD56^{bright} NK cell subset (45, 47). It appears therefore more appropriate to define CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells as target cell responsive and cytokine responsive, respectively (45). It is of note that all degranulating cells downmodulated their Fc γ RIIIA/CD16A, whereas the converse was not true. The shedding of Fc γ RIIIA/CD16A and CD62L induced by coengagement of NKG2D, NKp30, NKp46, and 2B4 was inhibited in the presence of TIMP-3 and TMI-2, showing that the ADAM17-dependent shedding of Fc γ RIIIA/CD16A was not restricted to stimulation conditions in which Fc γ RIIIA/CD16A was engaged, but extended to a wide range of Fc γ RIIIA/CD16A-independent stimuli. We found that the percentages of cells downmodulating CD16 were substantially higher than the percentages of degranulating cells. This may be explained by the heterogeneous response of NK cells to a given stimulus, as demonstrated by Fauriat et al. (46). Indeed, these authors showed that within stimulated NK cells, CD107a⁺ cells were confined to a subset expressing MIP-1 β , whereas the reverse was not true: the expression of MIP-1 β was the sole functional response observed in a very large proportion of cells. In addition, some cells produced two or more responses in this stimulation condition, but CD107a expression did not necessarily correlate with the production of TNF- α or IFN- γ . It is thus likely that the NK cells downmodulating CD16 (CD16⁻) without degranulating (CD107⁻)

that we observed in our stimulation conditions had other functional responses such as chemokine or cytokine production. Another possible explanation for this finding was that ADAM17 expressed on an activated cell may shed the FcγRIIIA/CD16A on the cell surface of a neighboring cell (i.e., in *trans*). However, when CD16/γ-transduced T cells and NK cells were mixed, the shedding of FcγRIIIA/CD16A was restricted to T cells after CD3 engagement and to NK cells after NKG2D, NKp30, NKp46, and 2B4 coengagement. The shedding of FcγRIIIA/CD16A was limited to appropriately stimulated cells and is therefore likely to occur mainly, if not exclusively, in cis.

We conclude that FcγRIIIA/CD16A shedding may be considered as a marker of FcγRIIIA-independent activation of human CD56^{dim} NK cells strongly correlated with degranulation. On the basis of our results obtained with CD3-stimulated T cells, it is tempting to speculate that ADAM17-dependent shedding of membrane proteins is a general mechanism taking place during the process of lymphocyte activation. The identification of the cleavage site may help in the designing of inhibitors that could enhance FcγRIIIA-dependent functions of NK cells such as Ab-dependent cell cytotoxicity.

Acknowledgments

We thank Emmanuelle Liaudet-Coopman for discussing the results and improving the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Clémenceau, B., R. Vivien, M. Berthomé, N. Robillard, R. Garand, G. Gallot, S. Vollant, and H. Vié. 2008. Effector memory alphaβ T lymphocytes can express FcγRIIIa and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Immunol.* 180: 5327–5334.
- Harrison, D., J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 1991. Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J. Immunol.* 147: 3459–3465.
- Borrego, F., A. Lopez-Beltran, J. Peña, and R. Solana. 1994. Downregulation of Fc gamma receptor IIIA alpha (CD16-II) on natural killer cells induced by anti-CD16 mAb is independent of protein tyrosine kinases and protein kinase C. *Cell. Immunol.* 158: 208–217.
- Congy-Jolivet, N., A. Bolzec, D. Ternant, M. Ohresser, H. Watier, and G. Thibault. 2008. Fc gamma RIIIa expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma RIIIa-158V allotype. *Cancer Res.* 68: 976–980.
- Cecchetti, S., F. Spadaro, L. Lugini, F. Podo, and C. Ramoni. 2007. Functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in regulating CD16 membrane expression in natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 37: 2912–2922.
- Bowles, J. A., S.-Y. Wang, B. K. Link, B. Allan, G. Beuerlein, M.-A. Campbell, D. Marquis, B. Ondek, J. E. Wooldridge, B. J. Smith, et al. 2006. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood* 108: 2648–2654.
- Gryzwacz, B., N. Kataria, and M. R. Verneris. 2007. CD56(dim)CD16(+) NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases. *Leukemia* 21: 356–359, author reply 359.
- Reiss, K., and P. Saftig. 2009. The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20: 126–137.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, et al. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-α from cells. *Nature* 385: 729–733.
- Kahn, J., R. H. Ingraham, F. Shirley, G. I. Migaki, and T. K. Kishimoto. 1994. Membrane proximal cleavage of L-selectin: identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin. *J. Cell Biol.* 125: 461–470.
- Condon, T. P., S. Flournoy, G. J. Sawyer, B. F. Baker, T. K. Kishimoto, and C. F. Bennett. 2001. ADAM17 but not ADAM10 mediates tumor necrosis factor-α and L-selectin shedding from leukocyte membranes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 11: 107–116.
- Yan, Y., K. Shirakabe, and Z. Werb. 2002. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J. Cell Biol.* 158: 221–226.
- Walcheck, B., A. H. Herrera, C. St Hill, P. E. Mattila, A. R. Whitney, and F. R. Deleo. 2006. ADAM17 activity during human neutrophil activation and apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 36: 968–976.
- Middelhoven, P. J., A. Ager, D. Roos, and A. J. Verhoeven. 1997. Involvement of a metalloprotease in the shedding of human neutrophil Fc gammaRIIIB. *FEBS Lett.* 414: 14–18.
- Bergin, D. A., E. P. Reeves, P. Meleady, M. Henry, O. J. McElvaney, T. P. Carroll, C. Condron, S. H. Chotirmall, M. Clynes, S. J. O'Neill, and N. G. McElvaney. 2010. α-1 Antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8. *J. Clin. Invest.* 120: 4236–4250.
- Guo, S., M. Peng, Q. Zhao, and W. Zhang. 2012. Role of ADAM10 and ADAM17 in CD16b shedding mediated by different stimulators. *Chin. Med. Sci. J.* 27: 73–79.
- Wang, Y., J. Wu, R. Newton, N. S. Bahaie, C. Long, and B. Walcheck. 2013. ADAM17 cleaves CD16b (FcγRIIb) in human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 680–685.
- Romee, R., B. Foley, T. Lenvik, Y. Wang, B. Zhang, D. Ankarlo, X. Luo, S. Cooley, M. Verneris, B. Walcheck, and J. Miller. 2013. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood* 121: 3599–3608.
- Ravetch, J. V., and B. Perussia. 1989. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J. Exp. Med.* 170: 481–497.
- Scallan, B. J., E. Scigliano, V. H. Freedman, M. C. Miedel, Y. C. Pan, J. C. Unkeless, and J. P. Kochan. 1989. A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide-anchored and phosphatidylinositol-glycan-anchored forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5079–5083.
- Selvaraj, P., W. F. Rosse, R. Silber, and T. A. Springer. 1988. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature* 333: 565–567.
- Huizinga, T. W., C. E. van der Schoot, C. Jost, R. Klaassen, M. Kleijer, A. E. von dem Borne, D. Roos, and P. A. Tetteroo. 1988. The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature* 333: 667–669.
- Galon, J., I. Moldovan, A. Galinha, M. A. Provost-Marloie, H. Kaudewitz, S. Roman-Roman, W. H. Fridman, and C. Sautès. 1998. Identification of the cleavage site involved in production of plasma soluble Fc gamma receptor type III (CD16). *Eur. J. Immunol.* 28: 2101–2107.
- Avril, T., A. C. Jarrousseau, H. Watier, J. Boucraut, P. Le Bouteiller, P. Bardos, and G. Thibault. 1999. Trophoblast cell line resistance to NK lysis mainly involves an HLA class I-independent mechanism. *J. Immunol.* 162: 5902–5909.
- Dall'Ozzo, S., S. Tartas, G. Paintaud, G. Cartron, P. Colombat, P. Bardos, H. Watier, and G. Thibault. 2004. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* 64: 4664–4669.
- Cadene, M., and B. T. Chait. 2000. A robust, detergent-friendly method for mass spectrometric analysis of integral membrane proteins. *Anal. Chem.* 72: 5655–5658.
- Gabant, G., and M. Cadene. 2008. Mass spectrometry of full-length integral membrane proteins to define functionally relevant structural features. *Methods* 46: 54–61.
- Levin, J. I., J. M. Chen, K. Cheung, D. Cole, C. Crago, E. D. Santos, X. Du, G. Khafizova, G. MacEwan, C. Niu, et al. 2003. Acetylenic TACE inhibitors. Part I. SAR of the acyclic sulfonamide hydroxamates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 2799–2803.
- Caescu, C. I., G. R. Jeschke, and B. E. Turk. 2009. Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem. J.* 424: 79–88.
- Lima, M., M. A. Teixeira, M. L. Queirós, M. Leite, A. H. Santos, B. Justica, and A. Orfão. 2001. Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+lo versus CD56+hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells Mol. Dis.* 27: 731–743.
- Huovila, A.-P. J., A. J. Turner, M. Pelto-Huikko, I. Kärkkäinen, and R. M. Ortiz. 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.* 30: 413–422.
- Borland, G., G. Murphy, and A. Ager. 1999. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 2810–2815.
- Zhang, Y., M. Hegen, J. Xu, J. C. Keith, Jr., G. Jin, X. Du, T. Cummons, B. J. Sheppard, L. Sun, Y. Zhu, et al. 2004. Characterization of (2R, 3S)-2-[(4-(2-butynyloxy)phenyl)sulfonyl]amino)-N-3-dihydroxybutanamide, a potent and selective inhibitor of TNF-α converting enzyme. *Int. Immunopharmacol.* 4: 1845–1857.
- Bryceson, Y. T., M. E. March, H.-G. Ljunggren, and E. O. Long. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107: 159–166.
- Göstring, L., M. T. Chew, A. Orlova, I. Höiden-Guthenberg, A. Wennborg, J. Carlsson, and F. Y. Frejd. 2010. Quantification of internalization of EGFR-binding Affibody molecules: Methodological aspects. *Int. J. Oncol.* 36: 757–763.
- Clémenceau, B., N. Congy-Jolivet, G. Gallot, R. Vivien, J. Gaschet, G. Thibault, and H. Vié. 2006. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes. *Blood* 107: 4669–4677.
- Contin, C., V. Pitard, T. Itai, S. Nagata, J.-F. Moreau, and J. Déchanet-Merville. 2003. Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-α-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J. Biol. Chem.* 278: 32801–32809.
- Yamauchi, A., K. Taga, H. S. Mostowski, and E. T. Bloom. 1996. Target cell-induced apoptosis of interleukin-2-activated human natural killer cells: roles of cell surface molecules and intracellular events. *Blood* 87: 5127–5135.
- Gardiner, E. E., J. F. Arthur, M. L. Kahn, M. C. Berndt, and R. K. Andrews. 2004. Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase. *Blood* 104: 3611–3617.

40. Seals, D. F., and S. A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17: 7–30.
41. Zheng, Y., P. Saftig, D. Hartmann, and C. Blobel. 2004. Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) shedding and of the function of the TNFalpha ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNFalpha convertase (TACE/ADAM17). *J. Biol. Chem.* 279: 42898–42906.
42. Horiuchi, K., S. Le Gall, M. Schulte, T. Yamaguchi, K. Reiss, G. Murphy, Y. Toyama, D. Hartmann, P. Saftig, and C. P. Blobel. 2007. Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol. Biol. Cell* 18: 176–188.
43. Wang, S.-Y., E. Racila, R. P. Taylor, and G. J. Weiner. 2008. NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood* 111: 1456–1463.
44. Beum, P. V., E. M. Peek, M. A. Lindorfer, F. J. Beurskens, P. J. Engelberts, P. W. H. I. Parren, J. G. J. van de Winkel, and R. P. Taylor. 2011. Loss of CD20 and bound CD20 antibody from opsonized B cells occurs more rapidly because of trogocytosis mediated by Fc receptor-expressing effector cells than direct internalization by the B cells. *J. Immunol.* 187: 3438–3447.
45. Anfossi, N., P. André, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetynck, C. A. Stewart, V. Bresó, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, et al. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25: 331–342.
46. Fauriat, C., E. O. Long, H.-G. Ljunggren, and Y. T. Bryceson. 2010. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115: 2167–2176.
47. Cooper, M. A., T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaeheri, T. Ghayur, W. E. Carson, and M. A. Caligiuri. 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97: 3146–3151.
48. Kurosaki, T., and J. V. Ravetch. 1989. A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of Fc gamma RIII. *Nature* 342: 805–807.
49. Ferguson, M. A., and A. F. Williams. 1988. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 285–320.
50. Udenfriend, S., and K. Kodukula. 1995. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 563–591.
51. Udenfriend, S., and K. Kodukula. 1995. Prediction of omega site in nascent precursor of glycosylphosphatidylinositol protein. *Methods Enzymol.* 250: 571–582.

Résultats complémentaires de l'Article n°1

L'invalidation de la protéine ADAM17 ou l'inversion des deux acides aminés issus du site de clivage de la protéine FcγRIIIA/CD16A membranaire n'est pas suffisante pour empêcher la modulation du récepteur.

Introduction

Les résultats de la précédente étude ont montré qu'ADAM17 est l'une des enzymes impliquée dans la perte d'expression membranaire du récepteur FcγRIIIA/CD16A à la surface des cellules NK activées. En outre, lorsque les deux acides aminés impliqués dans le site de clivage sont inversés dans un peptide correspondant à la partie juxta-membranaire du FcγRIIIA/CD16A, ADAM17 n'est plus capable de le cliver. Afin de pouvoir analyser l'influence de l'absence de clivage du FcγRIIIA/CD16A sur les réponses fonctionnelles des cellules NK, nous avons mis au point deux stratégies. La première a consisté à tenter d'invalider le gène de la protéine ADAM17 dans la lignée cellulaire NK92CD16 par la méthode des shRNA. La seconde stratégie a été de transfecter un FcγRIIIA/CD16A humain contenant ou non l'inversion des deux acides aminés impliqués dans le site de clivage dans une lignée NK92.

Résultats

Nous avons déterminé par PCR quantitative en temps réelle l'expression des transcrits ADAM17 après la transfection des shRNA ADAM17 dans les cellules NK92CD16. Parmi les 48 clones sélectionnés, 33 dont le clone contrôle ont pu être renseigné (Figure 16). Ainsi, la méthode des shRNA nous a permis d'obtenir un panel de lignée cellulaire NK92CD16 pour lesquelles l'expression protéique d'ADAM17 est variable (Figure 16). Nous avons retenu 2 clones : le clone 3.1, qui présentait une expression des transcrits ADAM17 diminué de 90% ; et le clone 3.9, qui présentait une diminution intermédiaire à hauteur de 60% par rapport au clone CTR. Nous avons ainsi pu analyser l'impact de l'extinction protéique d'ADAM17 sur la modulation du récepteur CD16 humain transfecté dans les cellules NK92. Les résultats de

cytométrie en flux ont révélé que le clone 3.1 est capable d'inhiber à $9,5 \pm 4,9\%$ ($n=5$) la modulation du CD16 à la surface des cellules NK92CD16 activées par l'engagement du CD16 par un anti-CD16 clone 3G8 ou par le co-engagement des récepteurs activateurs NKG2D et NKp30, ou après stimulation par le PMA ou le N-éthylmaleimide. Ainsi, une extinction des transcrits d'ADAM17 à hauteur de 90% est insuffisante pour inhiber significativement la modulation du récepteur CD16 à la surface des cellules NK92CD16 activées (Figure 17).

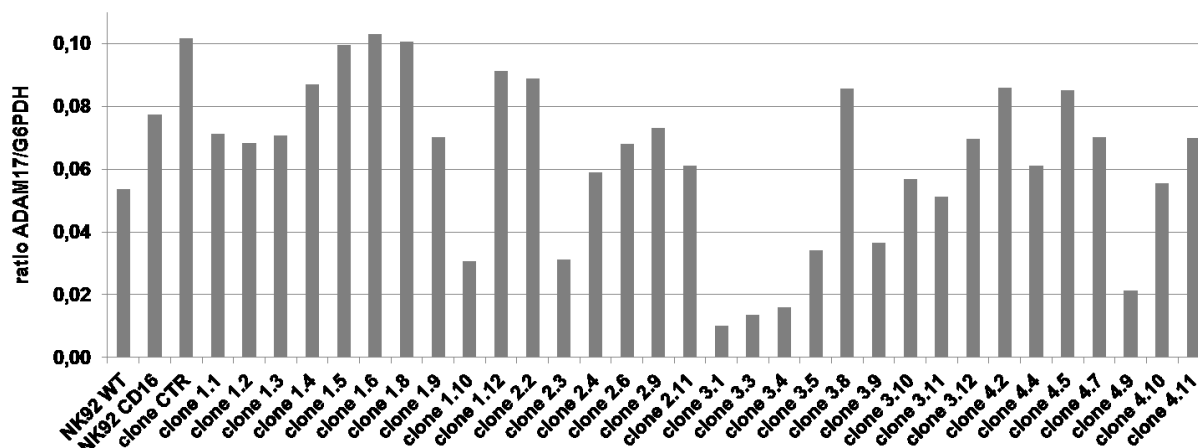


Figure 16 : Expression des transcrits ADAM17 de 35 lignées NK92 avant et après transfection du CD16 humain et des shRNA ADAM17. Ratio ADAM17/G6PDG correspond à la valeur de cycle seuil obtenue pour ADAM17 (notre cible) par rapport à celle de la G6PDH (notre référence) pour une standardisation des valeurs.

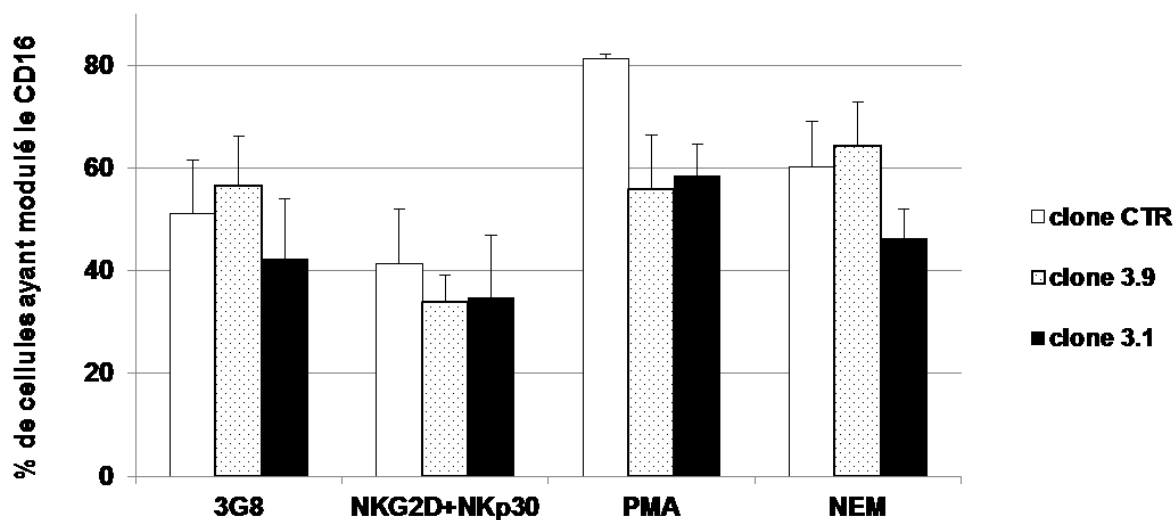


Figure 17 : Perte d'expression du CD16 à la surface des cellules NK92 CD16 shRNA après activation. Les cellules (1.10^6 cellules/ml) ont été incubées en RPMI sans SVF ni IL2, dans la plaque sensibilisée par $5\mu\text{g/mL}$ d'anticorps anti-CD16 (3G8) ou par une combinaison d'anticorps ciblant les récepteurs activateurs NKG2D et NKp46 pendant 4hrs comme décrit précédemment (Congy-Jolivet et al., 2008), ou stimulées avec $0,2\text{mM}$ de N-éthylmaléimide pendant 15 minutes ou $1\mu\text{g/mL}$ de PMA pendant 2 heures à 37°C sous 5% de CO_2 . L'expression du CD16 à la surface des deux lignées cellulaires de NK92 a été évaluée par cytométrie en flux. Les pourcentages de cellules ayant modulé le CD16 ont été calculé d'après la formule suivante : $\% = [(A-B)/A] \times 100$ où A correspond à la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du CD16 à la surface des cellules non stimulées et B à la MFI du CD16 à la surface des cellules stimulées. Le pourcentage moyen ($n=5$) obtenu pour la lignée du clone contrôle exprimant 100% des transcrits ADAM17 (blanc), du clone 3.9 exprimant environ 40% des transcrits ADAM17 (pointillé) et du clone 3.1 exprimant 10% des transcrits ADAM17 (noir) est indiqué pour chaque stimulation avec l'écart-type moyen.

Concernant la seconde stratégie, nous avons comparé par cytométrie en flux la perte d'expression membranaire du CD16 à la surface des cellules NK92 transfectées par le CD16 humain muté (NK92 hCD16(VA)) ou non (NK92hCD16) après une stimulation cellulaire du PMA ou du N-éthylmaléimide. L'analyse de l'expression du CD16 à la surface des deux lignées cellulaires a révélé que l'inversion des acides aminés issus du site de clivage n'est pas suffisante pour protéger le récepteur $\text{Fc}\gamma\text{RIII}/\text{CD16A}$ du mécanisme enzymatique dépendant d'ADAM17 (Figure 18).

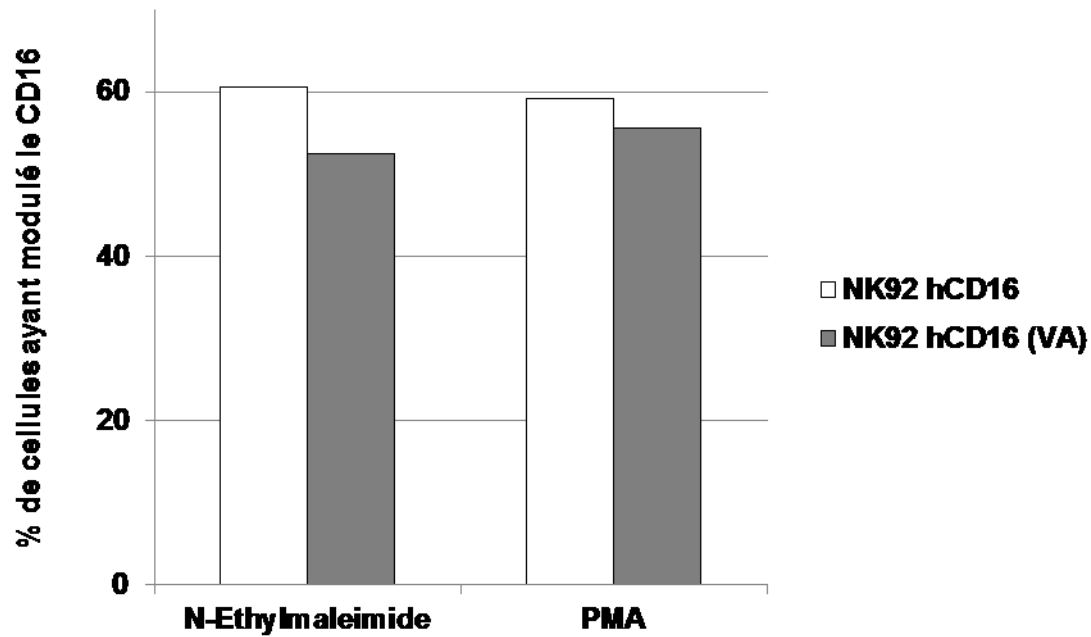


Figure 18 : Perte d'expression de CD16 à la surface des cellules NK92 transfectées par le CD16 humain (NK92 hCD16) ou le CD16 humain muté au niveau du site de clivage (NK92 hCD16 (VA)) après activation. Les cellules (5.10^5 cellules/ml) ont été incubées en RPMI sans supplément en SVF ni en IL2, en absence ou en présence de 0,2mM de N-éthylmaléimide pendant 15 minutes ou de 1µg/ml de PMA pendant 2 heures à 37°C sous 5% de CO₂. L'expression du CD16 à la surface des deux lignées cellulaires de NK92 a été évaluée par cytométrie en flux. Les pourcentages de cellules ayant modulé le CD16 ont été calculé d'après la formule présentée dans la légende de la figure précédente.

Discussion

Le fait que l'extinction de la protéine ADAM17 n'est eu qu'une très faible influence (environ 10%) sur la modulation du FcγRIIIA/CD16A membranaire indique qu'une réduction de 90% des transcrits ADAM17 n'est pas suffisante pour avoir un impact au niveau cellulaire ou qu'ADAM17 n'est pas la seule enzyme à être impliquée dans la perte d'expression membranaire du récepteur. Différentes études suggèrent que les deux hypothèses exposées sont possibles. En effet, nous et d'autres avons montré que l'inhibition spécifique d'ADAM17 préserve la modulation du récepteur à la surface des cellules NK après leur activation (Romee et al., 2013; Lajoie et al., 2014). Toutefois, une étude récente a montré que la métalloprotéase MMP25 était également capable de cliver le FcγRIIIA/CD16A à la surface des cellules NK (Peruzzi et al., 2013) indiquant que d'autres enzymes peuvent être impliquée dans ce mécanisme. Il serait donc intéressant de déterminer si le site de clivage que nous avons identifié est commun aux autres enzymes dont la MMP25. Toutefois, bien que les résultats

moléculaires aient révélé que le site de clivage se situait spécifiquement entre l'Alanine en position 195 et la valine en position 196 et que l'inversion des deux acides aminés empêchait le clivage par ADAM17 d'un peptide ayant la séquence juxta-membranaire du FcγRIIIA/CD16A (Lajoie et al., 2014, Figure 2), il semble, d'après nos résultats préliminaires, que cette inversion ne soit pas suffisante pour inhiber le décapage du récepteur sous sa forme membranaire après activation cellulaire. Cette observation suggère que l'interaction entre l'enzyme recombinante et le peptide mime de manière imparfaite l'interaction entre l'enzyme membranaire et le récepteur membranaire. L'existence de sites de clivage spécifiques d'autres métalloprotéases impliquées dans ce mécanisme telles que la MMP25 pourrait également expliquer que le récepteur membranaire soit encore clivable. Finalement, l'inversion des deux acides aminés impliqués dans le clivage du FcγRIIIA/CD16A pourrait entraîner une modification conformationnelle du récepteur membranaire exposant ainsi de nouveaux sites d'interaction potentiellement clivable. Nous et d'autres avons observé que la modulation du CD16 dépendant d'ADAM17 n'est pas observé chez la souris (Wang et al., 2012; Romee et al., 2013). En effet, après activation cellulaire, le CD16murin ne subit pas de perte d'expression membranaire. Ainsi, la génération d'un récepteur FcγRIIIA/CD16A chimérique pourrait être une alternative pour l'obtention d'un récepteur FcγRIIIA/CD16A non clivable à la surface des cellules NK92.

Deuxième partie : Étude de la relation entre l'expression des récepteurs inhibiteurs et les réponses fonctionnelles (dégranulation et synthèse d'IFN- γ) des cellules NK CD56^{dim} activées par l'engagement du Fc γ RIIIA/CD16A.

Article n°2:

Influence of inhibitory receptor expression and *FCGR3A* polymorphism on the functional responses of CD56^{dim} NK cells to Fc γ RIIIa engagement.

Lajoie L, Congy-Jolivet N, Bolzec A, Elodie Sicard E, Sung Hsueh Cheng, Watier Hervé, Thibault G. *A soumettre*.

Introduction

L'engagement du récepteur FcγRIIIA/CD16A par un anticorps anti-CD16 clone 3G8 ou le co-engagement des récepteurs activateurs (Lajoie et al., 2014; Figure 5A et Figure supplémentaire 1A) des cellules polyclonales NKCD56^{dim} induisent simultanément la dégranulation et la production d'IFN-γ. Nous avons observés au cours de ces expériences, en accord avec des résultats précédemment rapportés (Anfossi ref immunity 2006), que les cellules NK d'un individu sain qui dégranulaient en réponse à l'engagement du FcγRIIIA/CD16A par l'anticorps anti-CD16 3G8 ou par le co-engagement des récepteurs activateurs (Lajoie et al., 2014) étaient partiellement différentes de celles qui produisaient de l'IFN-γ. Ces résultats suggéraient que les deux réponses fonctionnelles des cellules NK s'acquièrent de manière indépendante.

Le but était de déterminer si les réponses effectrices des cellules NKCD56^{dim} sont associées à l'expression de récepteurs inhibiteurs particuliers, *i.e.* certains récepteurs inhibiteurs pourraient être des facteurs prédictifs de la réponse effectrice dépendante de l'engagement du FcγRIIIA/CD16A des cellules NK.

Nous avons, par une approche de cytométrie de flux, analysé l'expression des récepteurs inhibiteurs NKG2A, CD158A et CD158b à la surface des cellules NKCD56^{dim} qui répondent exclusivement par la dégranulation ou par la production d'IFN-γ ou produisant les deux réponses, après une stimulation cellulaire restreinte à l'engagement du FcγRIIIA/CD16A capable de déclencher à la fois la dégranulation et la production de cytokine telle que l'IFN-γ.

Les résultats ont confirmé qu'il existe une ségrégation fonctionnelle partielle au sein des cellules répondeuses après l'engagement du FcRIIIA/CD16A par l'anti-CD16 3G8 révélant ainsi trois populations de cellules : les cellules NKCD56^{dim} qui répondent uniquement par la dégranulation (NKCD56^{dim}CD107a⁻IFN-γ⁺), par la production d'IFN-γ (NKCD56^{dim}CD107a⁻IFN-γ⁺) et par les deux types de réponses (NKCD56^{dim}CD107a⁺IFN-γ⁺). Toutefois, il est à noté que ces dernières sont minoritaires. Bien qu'une relation concentration-effet soit observable et similaire pour les cellules strictement CD107a⁺ et IFN-γ⁺, la majorité des cellules présente une réponse fonctionnelle unique qui ne dépend pas d'une différence de cinétique entre les deux types de réponse. En outre, il existe une importante variabilité interindividuelle des deux réponses qui n'est pas influencée par le polymorphisme V158F du

gène FCGR3A quand les cellules sont stimulées par le 3G8 (qui a une affinité proche pour les deux allotypes (Congy-Jolivet 2008)). Ainsi l'orientation fonctionnelle des cellules NK répondeuses après l'engagement du FcRIIIA/CD16A par le 3G8 dépend uniquement du donneur. Toutefois, les réponses fonctionnelles des cellules NKCD56^{dim} stimulées par un AcMo thérapeutique tel que le rituximab ou le trastuzumab qui engage le FcRIIIA/CD16A par la portion Fc sont davantage corrélées car dans ce cas les deux réponses dépendent quantitativement du polymorphisme du FCGR3A (VV>VF>FF). Finalement, les profils d'expression des récepteurs inhibiteurs NKG2A et KIRs (CD158a et CD158b) sont différents au sein des cellules NKCD56^{dim} qui répondent par la dégranulation et par la production d'IFN- γ . L'acquisition d'un récepteur inhibiteur permet l'acquisition d'une réponse fonctionnelle. Toutefois, si les cellules NKCD56^{dim}, qui répondent exclusivement par la dégranulation sont enrichies de manière similaire en cellules NKG2A⁺, CD158b⁺ et CD158a⁺, les cellules qui produisent l'IFN- γ sont fortement enrichies en cellules CD158a⁺ et CD158b⁺ mais appauvries en cellules NKG2A⁺. Ce profil est observé que les cellules aient été stimulées par le 3G8 (de manière indépendante du polymorphisme de FCGR3A) ou avec des anticorps thérapeutiques (de manière dépendante du polymorphisme). L'orientation des réponses effectrices des cellules NKCD56^{dim} induites par l'engagement du FcRIIIA/CD16A dépend de l'expression des récepteurs inhibiteurs et plus particulièrement, l'expression des récepteurs KIRs est fortement associée à la production d'IFN- γ .

Influence of inhibitory receptor expression and *FCGR3A* polymorphism on the functional responses of CD56^{dim} NK cells to FcγRIIIa engagement

Laurie Lajoie¹, Nicolas Congy-Jolivet^{1,2}, Armelle Bolzec^{1,2}, Elodie Sicard^{1,2,3}, Hsueh Cheng Sung^{1,2}, Herve Watier^{1,2} and Gilles Thibault^{1,2}

¹CNRS UMR 7292, Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer (GICC), Université François-Rabelais de Tours, 37032 TOURS Cedex, France.

²Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, laboratoire d'Immunologie, 37044 TOURS Cedex, France.

³ Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, 37044 TOURS Cedex, France.

Corresponding authors: Gilles THIBAULT, CNRS UMR 7292, Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer (GICC), Université François-Rabelais de Tours, Faculté de Médecine, 10, boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex, France.

Phone: +33 234 379 699. Fax: + 33 234 389 412. E-mail: gilles.thibault@univ-tours.fr

Running title: IFN-γ production associated with KIRs expression

Keywords: CD56^{dim} NK cell, FcγRIIIa; degranulation; IFN-γ; KIR; NKG2A; functional dichotomy; monoclonal antibody

Abbreviations: ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; AR: Activating receptor; HLA: Human Leucocyte Antigen; IR: Inhibitory receptor; KIR: Killer Immunoglobulin-like Receptor; mAb: monoclonal antibody; NCR: Natural Cytotoxicity Receptor; NK: Natural Killer; RTX: rituximab; TTZ: trastuzumab

Abstract

FcγRIIIa/CD16a is the sole activating receptor of CD56^{dim} NK cells whose engagement is sufficient to substantially induce degranulation and cytokine synthesis, although it is currently unclear how cells are directed toward these effector functions. Degranulation and/or IFN-γ-production and the expression of the inhibitory receptors NKG2A, CD158a and CD158b were therefore simultaneously evaluated after engagement of FcγRIIIa/CD16a, by plate-bound anti-CD16 3G8 mAb, rituximab or trastuzumab. After 4hrs of stimulation, CD107⁺IFN-γ⁻, CD107⁻IFN-γ⁺ and CD107⁺IFN-γ⁺ cells represented 61.1 ± 13.9%, 27.1 ± 14.2% and 11.8 ± 5.9% of responding CD56^{dim} NK cells, respectively. This partial functional segregation persisted for up to 20h of stimulation. The functional responses were not correlated according to the donors when cells were stimulated by 3G8, whereas a correlation clearly related to the *FCGR3A* polymorphism was observed when cells were stimulated by therapeutic mAbs. Finally, IFN-γ production was positively associated with CD158a and or CD158b expression and negatively with NKG2A expression whatever the type of FcγRIIIa engagement, whereas degranulation was positively and similarly associated with NKG2A, CD158a and or CD158b expression. We conclude that the KIR equipment of CD56^{dim} NK cells influence the balance between degranulation and IFN-γ production in response to the engagement of FcγRIIIa by therapeutic mAbs, in addition to the quantitative influence of the *FCGR3A* polymorphism on the magnitude of both responses.

Introduction

Innate immunity constitutes an important defense to infectious diseases and malignancies (1). Natural killer (NK) cells play a central role in host defense and immune regulation through their ability to lyse a wide variety of stressed target cells, including transformed, infected, transplanted and antibody-coated cells (2,3). NK cell effector functions include natural cytotoxicity or antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and secretion of cytokines such as IFN- γ and TNF- α . Two subsets of human NK cells have been identified according to the density of expression of CD56. CD56^{dim}CD16⁺CD3⁻ cells usually account for more than 90% of NK cells in peripheral blood, whereas CD56^{bright}CD16^{dim/-}CD3⁻ cells are more numerous in lymphoid organs (4-6). It has been suggested that the major effector function of the former is cytotoxicity, whereas the latter acts mainly by secretion of cytokines (4). However, most NK cells that are cytotoxic and/or produce IFN- γ upon stimulation by K562, antibody-coated target (7), *Drosophila* cells expressing ligands for the NK cell activating receptors (ARs) (8) or *Plasmodium falciparum* red blood cells (9) belong to the CD56^{dim} subset. On the other hand, NK cells that readily respond to monokines such as IL-12 or IL-15 belong to the CD56^{bright} NK cell subset (4, 7). It appears therefore more appropriate to define CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells as “target cell responsive” and “cytokine responsive,” respectively (7).

The regulation of NK cell functions depends on a very fine balance between activatory signals mediated by activating receptors (ARs) and inhibitory signals mediated by human leucocyte antigen (HLA)-specific inhibitory receptors (IRs) (8,10-12). ARs mainly include the natural cytotoxicity receptors (NCRs: NKp46/CD335, NKp44/CD336, NKp30/CD337), NKG2D/CD314 and Fc γ RIIIa/CD16a, one of the low affinity receptors for

72 IgG involved in ADCC (10-13). The *FCGR3A* gene, which encodes FcγRIIIa, displays a
73 functional allelic dimorphism generating allotypes with either a phenylalanine (F) or a valine
74 (V) at amino acid position 158 (14, 15). The presence of a V improves the affinity for IgG
75 (15-17) and is associated with higher functional and clinical responses to several therapeutic
76 mAbs (18-21). Other receptors such as 2B4/CD244, DNAM-1/CD226, CD2 and Nkp80 are
77 able to costimulate NK cells (11,12). ARs can signal independently, but functional responses
78 including cytotoxicity and cytokine synthesis require a combination of signals supplied by
79 two or more interactions between different receptor–ligand pairs (22,23). Fauriat *et al* showed
80 that the engagement of 2B4 or NKG2D sufficed for chemokine release, whereas induction of
81 TNF-α and IFN-γ required engagement of additional receptors and occurred later (8). In
82 addition, production of TNF-α and IFN-γ and degranulation were contained within the
83 chemokine-producing NK cell subset. However, production of TNF-α and IFN-γ did not
84 necessarily correlate with degranulation (8). On the other hand FcγRIIIa/CD16a was
85 previously reported to be the sole AR whose engagement is sufficient to substantially induce
86 degranulation and cytokine synthesis (22). Moreover, a partial dichotomy between IFN-γ
87 producing and degranulating NK cells has been previously reported although not specifically
88 discussed after FcγRIIIa-dependent stimulation of polyclonal NK cells (7). It is presently
89 unclear how a given activating signal may induce different functional responses such as
90 cytotoxicity and cytokine production in different subsets within polyclonal NK cells of a
91 given donor. IRs mainly include C-type lectin NKG2A/CD94 heterodimer receptor that
92 recognize HLA-E molecules and killer Ig-like receptor (KIR) NKG2A such as
93 KIR2DL1/CD158a, specific for HLA-C group C2 molecules, KIR2DL2/3/CD158b specific
94 for HLA-C group C1. (24,25). According to the process referred to as education or licensing
95 of NK cells, the acquisition of functional responses depends on the engagement of IRs with
96 self-ligand during their development. (7,26,27). Remarkably, KIRs are independently

expressed on NK cells from a given donor (variegated expression) and all NKG2A and KIR expression patterns are represented including NK cells lacking IRs for self, which remain hyporesponsive (26-28).

Here, we investigated the relationship between functional responses (*i.e.* degranulation and IFN- γ -production) of CD56^{dim} NK cells stimulated by plate-bound anti-CD16 mAb, rituximab and trastuzumab and the expression of NKG2A, CD158a and CD158b. To this end, we simultaneously evaluated degranulation through CD107 expression (29, 30), cytokine synthesis and phenotype analysis in the same cell preparation.

Results

Segregation of IFN γ -producing cells and degranulating cells within polyclonal CD56^{dim} NK cells stimulated by plate-bound anti-CD16 mAb.

Fc γ RIIIa was previously reported to be the sole AR whose engagement is sufficient to substantially induce degranulation and cytokine synthesis (22). In order to study both functional responses upon Fc γ RIIIa engagement, freshly isolated NK cells were first incubated for 4hrs in culture plates sensitized with increasing concentrations of the 3G8 anti-CD16 mAb, in the presence of an anti-CD107 mAb and brefeldin A. NK cells were then stained using anti-CD16 and anti-CD56 mAbs, permeabilized and finally stained with an anti-IFN- γ mAb before flow cytometry analysis. As expected, responding NK cells were mainly (CD107⁺ cells) or exclusively (IFN- γ ⁺ cells) CD56^{dim} NK cells (Fig. 1A), which express high levels of CD16, in contrast to CD56^{bright} NK cells. We have previously shown that the adsorption of 3G8 on the plates reached a plateau at 1 μ g/mL(13). Here we show that purified NK cells stimulated by plate-bound 3G8 displayed concentration-dependent CD107 expression and IFN- γ synthesis which were detected at 0.03 μ g/mL and reached a plateau at $\geq$ 1 μ g/mL (Fig. 1B). The concentration-effect relationships of the functional responses were thus very similar. More importantly, we observed a partial functional segregation in responding NK cells: CD107⁺IFN- γ ⁻, CD107⁻IFN- γ ⁺ and CD107⁺IFN- γ ⁺ were detected in polyclonal NK cells from all the donors tested. Thus, after a 4hrs Fc γ RIIIa engagement by plate-bound anti-CD16 mAb, the majority of responding cells exhibited a single functional response *i.e.* degranulation or IFN- γ production, although cells exhibiting both responses were also present. Similar results were obtained when cells were stimulated by plate bound-rituximab (RTX) or trastuzumab (TTZ) (data not shown)

It has been established that degranulation is much faster than cytokine release (8). The dichotomy of FcγRIIIa-dependent functional response on CD56^{dim} NK cell observed in figure 1B could therefore be explained by cells that degranulate and just produce cytokines after a further duration of activation. In order to investigate the dynamics of the different NK responses, we then examined the response of NK cells stimulated between 30min and 20hrs by a saturating concentration (5μg/mL) of plate-bound 3G8. As shown in figure 1C, degranulation and IFN-γ synthesis were detected after 2hrs. However, the percentages of CD107⁺ cells, IFN-γ⁺ cells and of CD107⁺ IFN-γ⁺ cells were similar at 4 and 6hrs. Segregation was still observed after 20hrs of stimulation although the percentage of CD107⁺ cells remained constant whereas IFN-γ⁺ cells tended to slightly decrease at this time. Thus the partial segregation of IFNγ-producing cells and degranulating cells within polyclonal NK cells stimulated upon FcγRIIIa engagement does not result from differences in the kinetics of these responses.

Segregation of IFNγ-producing cells and degranulating cells within CD56^{dim} NK cells upon FcγRIIIa engagement depends on the donor

We then wondered whether the ability of polyclonal NK cells to degranulate and/or to produce IFN-γ may vary quantitatively with the donor. Therefore purified polyclonal NK cells from 26 healthy donors were stimulated by saturating concentration of plate-bound 3G8 during 4 hrs and then stained and analysed by flow cytometry as described above. Responding NK cells (i.e. CD107⁺IFN-γ⁻ or CD107⁻IFN-γ⁺ or CD107⁺IFN-γ⁺) represented 31.8% ± 12.3% of total NK cells on average. As expected, inter-individual variation was observed (range 7.8 to 52.9%). Among responding NK cell, CD107⁺IFN-γ⁻ were more numerous on average 61.1 ± 13.9%, followed by CD107⁻IFN-γ⁺ cells on average 27.1 ± 14.2% and double positive cells CD107⁺IFN-γ⁺ on average 11.8 ± 5.9%. However, a substantial inter-individual variability in

the relative proportion of the 3 subpopulations was also observed as exemplified in figure 2B showing results obtained in 4 donors. For instance, compared to the 3 other donors the number of responding NK cells was low in donor 1, the CD107⁺IFN- γ ⁻ cells were the large majority of responding cells within donor 2, whereas the CD107⁻IFN- γ ⁺ and CD107⁺IFN- γ ⁺ cells were more frequent in donor 3 and 4, respectively. Given these quantitative and qualitative variations, we tested the correlation between the percentage of CD107⁺IFN- γ ⁻ NK cells and that of CD107⁻IFN- γ ⁺ NK cells obtained in the 26 donors. We found that the functional responses according to the donors were not correlated ($r^2=0.02$) (Figure 2B). Results were similar when the correlation between all degranulating cells (CD107⁺IFN- γ ⁻ and CD107⁻IFN- γ ⁺) and all IFN- γ -producing cells (CD107⁻IFN- γ ⁺ and CD107⁺IFN- γ ⁺) was tested. These results support the notion of functional orientation of individual responding NK cells upon Fc γ RIIIa engagement by 3G8, which is highly donor-dependent. It is of note that in accordance with our previous observations (13), stimulation of NK cells by the 3G8 mAb was independent on the V158F polymorphism of Fc γ RIIIa as shown in supplementary figure1 in which the genotype of 18 among the 26 donors is indicated. On the other hand, when purified NK cells from the same 18 donors were stimulated by a plate-bound therapeutic mAb such as RTX (Supplementary Figure, right panel) or TTZ (not shown) which engages the Fc γ RIIIa by its Fc portion some correlation between the responses was observed. The correlation was clearly related to the *FCGR3A* polymorphism: NK cells from FF donors leading to lower responses (both degranulation and IFN- γ production) than NK cells from VF donors itself lower that of NK cells from VV donors. Thus in this situation the magnitude of each functional response depends on the affinity of the Fc portion for the Fc γ RIIIa and consequently on the *FCGR3A* genotype.

Expression of KIR and NKG2A on IFN γ -producing cells and degranulating CD56^{dim} NK cells upon Fc γ RIIIa engagement.

It is well known that the IRs expression on NK cells partially governs the functional responses of NK cells to Fc γ RIIIa-independent stimulation (24-28). Given the observed variability in functional response of NK cells upon Fc γ RIIIA engagement by 3G8, we then wondered whether degranulation and/or IFN- γ production induced by Fc γ RIIIa engagement could be related to the IRs equipment of individual NK cells. We therefore evaluated NKG2A, CD158a and CD158b expression on total, CD107⁻IFN- γ ⁻ (DN) CD107⁺IFN- γ ⁻, CD107⁻IFN- γ ⁺ and CD107⁺IFN- γ ⁺ (DP) CD56^{dim} NK cells from 8 donors (4 C1C1 and 4 C1C2) after 4hrs stimulation by plate-bound anti-CD16 mAb 3G8, RTX or TTZ. Firstly we observed as expected that CD56 bright cells were all NKG2A+CD158a-CD158b-, whereas NKG2A, CD158a and CD158b were all expressed on a fraction of CD56^{dim} NK cells. Some CD107⁺IFN- γ ⁻ but no IFN- γ ⁺ (either CD107⁺ or CD107⁻) cells were detected within CD56^{bright} after Fc γ RIIIa engagement by 3G8 suggesting that the rare CD56⁺⁺CD16⁺ NK cells are able to degranulate but not to produce IFN- γ upon Fc γ RIIIa engagement (Figure 3A). Concerning the IR expression on total NK cells we observed as expected that the percentages of NK cells expressing each IR varied substantially with the donor (Figure 3B), whereas these percentages were not changed after Fc γ RIIIa engagement by plate bound 3G8, RTX or TTZ within a given individual. When we compared the profile of IRs expression according to the functional responses to that observed on total CD56^{dim} NK cells from each donor, we found that they were substantially different as shown in figure 3A for one donor and in figure 3B for 8 donors (given the inter-individual IR expression variability we calculated the ratios of the percentage of cells expressing a given IR within each subpopulation of responding cells divided by the percentage of cells expressing this IR in the total CD56^{dim} NK cells of the donor. A ratio < or > to 1 indicate that the proportion of NK cells expressing this IR within the corresponding

functionally responding cells is decreased or increased as compared to the proportion in total CD56^{dim} NK cells of the donor). First, CD107⁻IFN- γ ⁻ non responding cells which represent the majority of the cells, contained similar percentage (although slightly lower) of NKG2A⁺, CD158a⁺ and CD158b⁺ as compared to total CD56^{dim} NK cells from the donor (not shown). Secondly, CD107⁻IFN- γ ⁺ contained decreased percentage of NKG2A⁺ (mean ratios 0.77, p=0.004) and, conversely, were substantially enriched in CD158b⁺ and of CD158a⁺ NK cells (mean ratios 2.00, p=0.004 and 1.85, p=0.004, respectively). Third, CD107⁺IFN- γ ⁻ contained slightly increased percentage of NKG2A⁺, CD158a⁺ and CD158b⁺ NK cells (mean ratios 1.17, 1.17, and 1.19, respectively p=0.004). Finally, the percentages of NKG2A⁺ CD158a⁺ and CD158b⁺ NK cells observed on CD107⁺IFN- γ ⁺ and CD107⁻IFN- γ ⁺ were similar. Importantly, results obtained after stimulation of NK cells by plate bound-TTZ or -RTX were similar to those obtained after 3G8 stimulation (Figure 3C). Taken together, these results indicate that CD56^{dim} NK cells from a given donor which produce IFN- γ after Fc γ RIIIa engagement are positively associated with CD158a and CD158b expression and negatively associated with NKG2A expression, whereas those which degranulate are positively although weakly associated with the 3 IRs. These results were confirmed when a reverse analysis was performed *i.e.* when the profile of the functional responses (the percentage of degranulating cells and of IFN- γ producing cells) according to the expression of each IR was evaluated. Indeed, we found that the percentage of IFN- γ -producing cells were increased among CD158a⁺ and or CD158b⁺ cells and decreased among NKG2A⁺ cells whereas the percentage of CD107⁺ cells were increased among NKG2A⁺ CD158a⁺ and or CD158b⁺ cells (data not shown). We conclude that there is an association between the expression of IRs and the functional responses of NK cells induced by Fc γ RIIIa engagement especially the production of IFN- γ is strongly associated with the expression of CD158a and CD158b but not the expression of NKG2A.

Discussion

In this study, we firstly showed that upon FcγRIIIa/CD16a engagement, polyclonal CD56^{dim}NK cells segregate into three functionally responding distinct subsets, *i.e.* degranulating cells, IFNγ-producing cells and cells exhibiting both functions. Although IFN-γ production was detected later than degranulation, the functional segregation persisted for up to 20 hrs of stimulation. Moreover, the relative proportion of each responding subset varied substantially with the donor. Degranulation and IFN-γ production were not correlated when the FcγRIIIA was engaged by the 3G8 mAb *i.e.* independently of the *FCGR3A* polymorphism. By contrast, some correlation between the responses was observed when the FcγRIIIa was engaged by the Fc portion of a therapeutic mAb *i.e.* when the functional responses depend on the affinity of the Fc portion for the FcγRIIIa and therefore on the *FCGR3A* polymorphism. Finally, our main finding was that IFN-γ production was positively associated with CD158a and or CD158b expression and negatively with NKG2A expression whatever the type of FcγRIIIa engagement (*i.e.* dependent or not of the *FCGR3A* polymorphism), whereas degranulation was positively associated with NKG2A, CD158a and or CD158b expression on CD56^{dim} cells. Thus, IFN-γ-producing CD56^{dim} NK cells upon FcγRIIIA engagement were preferentially recruited from CD158a⁺ or CD158b⁺ but not from NKG2A⁺ cells. We conclude that the KIR equipment of CD56^{dim} NK cells influence the balance between degranulation and cytokine production in response to the engagement of FcγRIIIa by therapeutic mAbs in addition to the quantitative influence of the *FCGR3A* polymorphism on the magnitude of both functional responses.

Two functionally distinct subsets have been previously described within human peripheral blood NK cells in relation to CD56 expression: CD56^{bright} act mainly by secretion of cytokines, whereas CD56^{dim} are more prone to exert cytotoxicity in relation to their higher

254 perforin and granzyme content in their granules (4, 5). This functional dichotomy may mainly
255 depend on the stimulating conditions: *i.e.* CD56^{bright} respond primarily to monokine
256 stimulation, whereas CD56^{dim} respond primarily to target cells, respectively (4, 7). Our results
257 differ from these observations. Indeed, the functional segregation was observed in response to
258 a defined stimulating condition *i.e.* FcγRIIIa engagement by plate-bound anti-CD16 or human
259 mAbs and was therefore restricted to CD56^{dim} cells. Several recent reports have shown that
260 IFN-γ⁺ and CD107⁺ NK cells could be expressed in a mutually exclusive manner. For
261 instance Foley et al have previously evaluated cytokine production and degranulation of
262 human healthy donor NK cells and of reconstituting NK cells after adult unrelated donor or
263 umbilical cord blood grafting (31). After a 4hrs target cell stimulation they observed a high
264 frequency of CD107a-expressing cells that did not produce IFN-γ an intermediate frequency
265 of cells exhibiting both responses and a low frequency of NK cells that produced IFN-γ but
266 did not express CD107a. In our hands the subset of CD56^{dim} NK cells that produce IFN-γ but
267 did not degranulate was usually substantially more numerous than double positive cells. This
268 discrepancy may be related to the type of stimulation (FcγRIIIa engagement *vs* target cells)
269 and to the fact that freshly purified NK cells were used in the present study *vs* thawed PBMC
270 in that of Foley et al. On the other hand our results are consistent with those reported by two
271 other groups after stimulation with K562 cells or plate-bound anti-CD16 mAb (7) and after
272 stimulation with *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells (9). Finally, Fauriat *et al.*
273 have also reported that TNF-α and IFN-γ production did not necessarily correlate with
274 degranulation in response to *drosophila* cells expressing the ligands for several ARs (8). They
275 assumed that this may reflect differences in the kinetics of the responses. Indeed, we observed
276 in agreement with this report that degranulation occurred earlier than IFN-γ production.
277 However, the dichotomy, which was observed as soon as the IFN-γ production was detected,
278 persisted for up to 20hrs. This finding rule out the hypothesis that the functional segregation

described in our study is related to the fact that cells that have already degranulated might produce IFN- γ later on. Moreover, we clearly observed a relationship between CD56^{dim} NK cell function and phenotype. Indeed, IFN- γ -producing NK cells tend to contain substantially increased proportions of cells expressing CD158a, CD158b and decreased proportion of NKG2A⁺ cells. These results indicate that IFN- γ -producing cells are preferentially recruited among (although not restricted to) NKG2A⁻KIR2D⁺ cells in our conditions of stimulation. By contrast, degranulating cells were similarly enriched in NKG2A⁺, CD158a⁺ or CD158b⁺ cells. The fact that IFN- γ -producing cells were mainly recruited from NKG2A⁻KIR⁺ cells, suggests that self-specific KIR would favour education toward IFN- γ secretion whereas education leading to degranulation could be achieved whatever the IR expressed on an NK cells. Our results obtained after Fc γ RIIIa stimulation of NK cells are consistent with those reporting that KIR expression was required for target cell-induced IFN- γ production by NK cells reconstituting after HCT whereas degranulation only required NKG2A expression (31). However, it is noteworthy that CD56^{dim}CD62L⁺ NK cells which produce high levels of IFN- γ in response to IL12 and IL-18 contain low percentages of KIR⁺ cells as compared to CD56^{dim}CD62L⁻ NK cells (32). Therefore, the relationship between NKG2A/KIR expression and the function of CD56^{dim} NK cells may depend on the stimulating conditions (Fc γ RIIIa or target cells vs cytokine stimulation).

It has been reported that distinct intracellular signalling pathways lead either to cytokine secretion or cytotoxicity (34-38). By contrast, the ability of one AR such as Fc γ RIIIa to preferentially induce one or the other response in individual NK cells demonstrates that a given pathway may lead to different responses in different NK cells from a given donor. This result suggests that NK cells might be committed to a given functional response by the education process. The segregation of effector functions within CD56^{dim} NK cells supports the recently proposed hypothesis that NK cell education is not an on-off switch but a rheostat

(39-43). In this model, the tuning of each NK cell's responsiveness is commensurate with the number of IRs for self-specific MHC Class I. The education of NK cells in an MHC class I context with high educational impact may not only lead to a higher frequency of responding NK cells, but also to responding NK cells that exhibit a function requiring a higher level of activation such as cytokine synthesis. Degranulation, which requires a lower level of activation (8), could be exerted in a given individual by any cell expressing an IR. If this assumption is correct, it could be expected that the relative proportion of NK cells expressing low or high levels of KIRs, and therefore preferentially exhibiting IFN- γ synthesis, would depend on the donor, as observed in the present study.

It is not known which function (killing or cytokine production) is most important physiologically or to mediate clinical responses to monoclonal antibodies. Among the most convincing evidence that ADCC plays a role in mediating the clinically relevant anti-tumor response to therapeutic mAbs is the demonstration by our groups (17) and others (18-21) that the *FCGR3A* gene polymorphism is associated to clinical responses to different cytolytic mAbs such as RTX, TTZ or cetuximab. All these studies confirm that the Fc γ RIIIa-158V allotype is associated with the best therapeutic response. In accordance, a genotype-phenotype relationship was observed: the *FCGR3A* polymorphism influenced the concentration effect relationship of rituximab mediated ADCC by NK cells *in vitro* (16). It has to be pointed out however, that some VV patients are poor responders to these treatments, whereas some FF patients are good responders, suggesting that the affinity of the Fc γ RIIIa is not the sole parameter influencing the responses. Moreover, the pharmacogenetic studies demonstrate that Fc γ RIIIa-expressing cells are involved in the mechanism of actions of these mAbs but they do not demonstrate which Fc γ RIIIa-expressing cells and which effector functions are involved in the *in vivo* situation. It is generally considered that NK cells act through ADCC to mediate the mechanism of action of the different cytolytic mAbs. However, an indirect mechanism in

329 which NK cells act by recruiting cells via their cytokine production would be possible. Along
330 this line, variability related to the IRs equipment of NK cells could be involved in the
331 variability of the clinical responses observed in mAbs treated patients in addition to the
332 variability related to the *FCGR3A* polymorphism. Whether the donor-dependent orientation
333 toward cytokine production and/or cytotoxicity and the clinical responses to therapeutic mAbs
334 might be predicted by the relative proportion of NK cells expressing the different IRs in
335 addition to the *FGR3A* genotype in a given donor remain to be investigated.

Materials and Methods

mAbs

The following mAbs were used: Unconjugated-, FITC- and APC-Alexa Fluor 750-conjugated anti-CD16 (clone 3G8), APC-Alexa Fluor 700- conjugated anti-CD56 (clone N901), APC-conjugated anti-NKG2A (clone Z199), PeCy7-conjugated anti-IFN γ (clone 45.15), PE-conjugated anti- CD158a (clone EB6.B), PeCy5.5-conjugated anti-CD158b (clone GL183) and their isotype control were purchased from Beckman Coulter (Villepinte, France). PECy-7-conjugated anti-IFN γ (clone B27), FITC and PeCy-5-conjugated anti-CD107 (clone H4A3) and their isotype controls were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Rituximab and trastuzumab were kindly supplied by Dr.Tournamille (CHRU de Tours, France)

Donor NK cell purification and HLA classI genotyping

All healthy donors NK cells were prepared from peripheral blood mononuclear cells with the NK cell Isolation Kit II MACS (Miltenyi Biotec) as already described (19) and purity was always $\geq 95\%$. HLA classI genotyping was performed according to the standard method used by the "Etablissement Francais du Sang Centre Atlantique".

Coating culture plates with mAbs

NUNC Maxisorp culture plates (Fisher Labosi, Elancourt, France) were sensitized overnight for 12 h at 4°C with 5 μ g/mL of mAb engaging CD16 (*i.e.* anti-CD16 mAb, rituximab or trastuzumab). After three washes with PBS TWEEN solution (45 μ l of Tween 20 from Sigma Aldrich in 100mL of PBS), plates were saturated for 30 minutes with bovine serum albumin 1% (Sigma Aldrich), and then washed three times with PBS Tween.

361

362 *In vitro stimulation assay of NK cells, analysis of functional responses and inhibitory*
363 *receptor expression*

364 One hundred μL of freshly isolated NK cells (1.10^5) were laid down in plates sensitized with
365 indicated concentrations of mAbs directed at CD16. Cells were incubated at 37°C in 5% CO_2
366 humidified air (usually 4hrs; from 1h to 20hrs in kinetics experiments) in the presence of
367 FITC- or PC5- conjugated anti-CD107 mAb and $0.1\mu\text{g/mL}$ of BD GolgiPlug[®] containing
368 Brefeldin A (BD Biosciences). When indicated, cells were then stained with FITC- or APC-
369 Alexa Fluor 750 conjugated anti-CD16 mAb, APC -conjugated anti-NKG2A, PE-conjugated
370 anti-CD158a and PeCy5.5-conjugated anti-CD158b mAbs. Cells were then fixed and
371 permeabilized using BD Cytofix/cytoperm Plus[®] Kit (BD Biosciences) according to the
372 manufacturer's recommendations, and stained with PE- or PECy-7-conjugated anti-IFN γ
373 mAb respectively for 30 min at 4°C . Functional responses and phenotypes of cell subsets
374 were analyzed by flow cytometry

375

376 *Flow cytometry analysis*

377 All flow cytometry analyse were performed with 10 000 events using a Gallios flow
378 Cytometer and Kaluza version 1.2 version software (Beckman Coulter). A gate was set on
379 $\text{CD}56^{\text{dim}}\text{NK}$ cells, $\text{CD}107^-\text{IFN-}\gamma^-$ (DN), $\text{CD}107^+\text{IFN-}\gamma^-$, $\text{CD}107^-\text{IFN-}\gamma^+$ and $\text{CD}107^+\text{IFN-}\gamma^+$
380 (DP) $\text{CD}56^{\text{dim}}$ NK and the % of cells expressing each IR within each gated population was
381 established.

382

383 *Statistics*

384 Differences among inhibitory receptor expression were analyzed using the repeated measure
385 ANOVA, Bonferroni Multiple Comparisons Test. The following P values were considered

386 significant: *** $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.5$

387

388

Acknowledgements

389

390 The authors thank V. Gouilleux-Gruart and F. Darrouzain for helpful discussions.

391

Financial support:

393 This work has been funded with support from the “Ligue nationale contre le Cancer”, the
394 “Agence nationale pour la recherche” (AO 2005 “Emergence et Maturation de projet de
395 biotechnologie à fort potentiel de valorisation” and program “Investissements d’avenir Grant
396 Agreement LabEx MAbImprove: ANR-10-LABX-53”), the “Institut national du Cancer”, the
397 “Association Cancen” and the “Fondation Langlois”.

398

399 **Conflict-of-interest disclosure:** The authors have no financial conflicts of interest.

400

References

1. Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 40: 845–59.
2. Lanier, L.L. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 23:225–74.
3. Mesci, A., B. Ljutic, A.P. Makrigiannis, J.R. Carlyle. 2006. NKR-P1 biology: from prototype to missing self. *Immunol Res.* 35:13–26.
4. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, M.A. Caligiuri. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22:633-40.
5. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, S.C. Turner, K.S. Chen, B.A. Ghaheri, T. Ghayur, W.E. Carson, M.A. Caligiuri. 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 97:3146-51.
6. Lanier, L.L., J.H. Phillips, J.Jr. Hackett, M. Tutt, V. Kumar. 1986. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol.* 137:2735-39.
7. Anfossi, N., P. Andre, S. Guia, C.S. Falk, S. Roetynck, C.A. Stewart, V. Breso, C. Frassati, D. Revirion, D. Middleton, F. Romagné, S. Ugolini, E. Vivier. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity.* 25:331-42.
8. Fauriat, C., E.O. Long, H.G. Ljunggren, Y.T. Bryceson. 2010. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 115:2167-76.
9. Korbel, D.S., K.C. Newman, C.R. Almeida, D.M. Davis, E.M. Riley. 2005. Heterogeneous human NK cell responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol.* 175:7466-73.
10. Bryceson, Y.T., M.E. March, H.G. Ljunggren, E.O. Long. 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev.* 214:73-91.

- 425 11. Bryceson, Y.T., E.O. Long. 2008. Line of attack: NK cell specificity and integration of
426 signals. *Curr Opin Immunol.* 20:344-52.
- 427 12. Vivier, E., J.A. Nunes, F. Vely. 2004. Natural killer cell signaling pathways.
428 *Science.*306:1517-19.
- 429 13. Congy-Jolivet, N., A. Bolzec, D. Ternant, M. Ohresser, H. Watier, G. Thibault. 2008. Fc
430 gamma RIIIa expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma
431 RIIIa-158V allotype. *Cancer Res.* 68:976-80.
- 432 14. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. 1997 Fc
433 gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell
434 FcgammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.*
435 90:1109-14.
- 436 15. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly
437 RP.1997 A novel polymorphism of FcgammaRIIIa (CD16) alters receptor function and
438 predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest.* 100: 1059-70.
- 439 16. Dall'Ozzo, S., S. Tartas, G. Piantaud, G. Cartron, P. Colombat, P. Bardos, H. Watier, G.
440 Thibault. 2004. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of
441 FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* 64:4664-69.
- 442 17. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H.
443 Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in
444 IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood.* 2002.99:754-8.
- 445 18. Weng WK, Levy R. 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms
446 independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin*
447 *Oncol.* 21: 3940-7.
- 448 19. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, Frankel SR,
449 Touroutoglou N, Turnbull B, Anderson KC, Maloney DG, Fox EA. 2005 Polymorphisms

450 in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to
451 rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Oncol*.23:474-81.

452 20. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D,
453 Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A. 2008. Immunoglobulin G
454 fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in
455 patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26:1789-1796,

456 21. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, Lamy A,
457 Penault-Llorca F, Frébourg T, Michel P, Sabourin JC, Boissière-Michot F.
458 2008 Association of FcγRIIa and FcγRIIIa polymorphisms with clinical outcome in
459 metastatic colorectal cancer patients (mCRC) treated with cetuximab and irinotecan. *J Clin*
460 *Oncol*. 27, 1122-9

461 22. Bryceson, Y.T., M.E. March, D.F. Barber, H.G. Ljunggren, E.O. Long. 2005. Cytolytic
462 granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK
463 cells. *J Exp Med*. 202:1001-12.

464 23. Bryceson, Y.T., M.E. March, H.G. Ljunggren, E.O. Long. 2006. Synergy among receptors
465 on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*.
466 107:159-66.

467 24. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. 1996.
468 Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev*
469 *Immunol*.14:619-48.

470 25. Lanier LL. 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*.16:359-393.

471 26. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR,
472 Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. 2005. Licensing of natural killer
473 cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*.436:709-713.

- 474 27. Raulet DH, Vance RE. 2006. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*.
475 6:520-31.
- 476 28. Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Björklund AT,
477 Flodström-Tullberg M, Michaëlsson J, Rottenberg ME, Guzmán CA, Ljunggren HG,
478 Malmberg KJ. 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of
479 CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*. 116:3853-64.
- 480 29. Betts, M.R., J.M. Brenchley, D.A. Price, S.C. De Rosa, D.C. Douek, M. Roederer, R.A.
481 Koup. 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow
482 cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*. 281:65-78.
- 483 30. Gonzalez, V.D., N.K. Bjorkstrom, K.J. Malmberg, M. Moll, C. Kuylensstierna, J.
484 Michaëlsson, H.G. Ljunggren, J.K. Sandberg. 2008. Application of nine-color flow
485 cytometry for detailed studies of the phenotypic complexity and functional heterogeneity
486 of human lymphocyte subsets. *J Immunol Methods*. 330:64-74.
- 487 31. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, Weisdorf DJ, Miller JS.
488 2011. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of
489 cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood*. 118: 2784-92
- 490 32. Juelke, K., M. Killig, M. Luetke-Eversloh, E. Parente, J. Gruen, B. Morandi, G. Ferlazzo,
491 A. Thiel, I. Schmitt-Knosalla, C. Romagnani. 2010. CD62L expression identifies a unique
492 subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood*. 116:1299-307.
- 493 33. Zompi, S., F. Colucci. 2005. Anatomy of a murder--signal transduction pathways leading
494 to activation of natural killer cells. *Immunol Lett*. 97:31-39.
- 495 34. Kurago, Z.B., C.T. Lutz, K.D. Smith, M. Colonna. 1998. NK cell natural cytotoxicity and
496 IFN-gamma production are not always coordinately regulated: engagement of DX9 KIR+
497 NK cells by HLA-B7 variants and target cells. *J Immunol*. 160:1573-80.

498 35. Huntington, N.D., Y. Xu, S.L. Nutt, D.M. Tarlinton. 2005. A requirement for CD45
499 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary
500 natural killer cells. *J Exp Med.* 201:1421-33.

501 36. Malarkannan, S., J. Regunathan, H. Chu, Kutlesa S, Chen Y, Zeng H, Wen R, Wang D.
502 2007. Bcl10 plays a divergent role in NK cell-mediated cytotoxicity and cytokine
503 generation. *J Immunol.* 179:3752-62.

504 37. Hesslein, D.G., R. Takaki, M.L. Hermiston, A. Weiss, L.L. Lanier. 2006. Dysregulation of
505 signaling pathways in CD45-deficient NK cells leads to differentially regulated
506 cytotoxicity and cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:7012-17.

507 38. El Costa, H., A. Casemayou, M. Aguerre-Girr, M. Rabot, A. Berrebi, O. Parant, M.
508 Clouet-Delannoy, L. Lombardelli, N. Jabrane-Ferrat, D. Rukavina, A. Bensussan, M.P.
509 Piccinni, P. Le Bouteiller, J. Tabiasco. 2008. Critical and differential roles of NKp46- and
510 NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol.*
511 181:3009-17.

512 39. Bryceson, Y.T., H.G. Ljunggren, E.O. Long. 2009. *Blood.* 114:2657-66.

513 40. Brodin, P., T. Lakshmikanth, S. Johansson, K. Karre, P. Hoglund. 2009. The strength of
514 inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of
515 individual natural killer cells. *Blood.* 113:2434-41.

516 41. Joncker, N.T., N.C. Fernandez, E. Treiner, E. Vivier, D.H. Raulet. 2009. NK cell
517 responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-
518 MHC class I: the rheostat model. *J Immunol.* 182:4572-80.

519 42. Yawata, M., N. Yawata, M. Draghi, F. Partheniou, A.M. Little, P. Parham. 2008. MHC
520 class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell
521 repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood.* 112:2369-80.

522 43. Yu, J., G. Heller, J. Chewning, S. Kim, W.M. Yokoyama, K.C. Hsu. 2007. Hierarchy of
523 the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory
524 receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *J Immunol.* 179:5977-89.

Figure legends

Figure 1: Degranulation and IFN- γ synthesis by NK cells stimulated with plate-bound anti-CD16 mAb. Culture plates were sensitized overnight with a saturating concentration (5 μ g/mL, **A** & **C**) or increasing concentrations (**B**) of anti-CD16 3G8 mAb. Freshly isolated NK cells were then incubated for 4h (**A** & **B**) or during the indicated times (**C**) in coated plates in the presence of -PC5 conjugated anti-CD107 mAb and brefeldin A. Cells were then stained with -PE conjugated anti-CD56 mAb. Fixed and permeabilized NK cells were then stained with FITC-conjugated anti-IFN γ mAb and analyzed by flow cytometry. Results are from one representative experiment among three (obtained with NK cells from 3 different donors).

Figure 2: Donor variability in degranulation and IFN- γ synthesis by polyclonal NK cells upon Fc γ RIIIa engagement. Freshly isolated NK cells were stimulated as described in legend of fig. 1A. (**A**) Expression profiles of degranulating and IFN- γ -producing NK cells from 4 representative donors among 26 donors. (**B**) Correlation between percentages of degranulating and IFN- γ -producing NK cells from the 26 donors. The estimated regression lines with the correlation coefficient (R^2 value) are indicated.

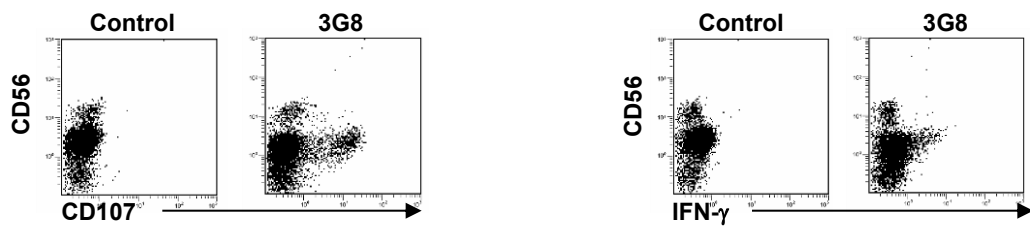
Figure 3: Expression of NKG2A, CD158b and CD158a on CD56^{dim} NK cells subsets before and after Fc γ RIIIa engagement. Freshly isolated NK cells were stimulated 4hrs by plate bound mAbs anti-CD16 3G8 mAb or rituximab or trastuzumab. The percentage of NKG2A⁺, CD158b⁺ and CD158a⁺ cells was evaluated on total unstimulated and stimulated CD107⁻IFN γ ⁻ (DN); CD107⁻IFN γ ⁺ (IFN γ producing cells), CD107⁺IFN γ ⁻ (degranulating cells)

550 and CD107⁺ IFN γ ⁺ (DP) CD56^{dim} NK cells from 8 donors. **(A)** One representative experiment
551 showing the gating strategy and results from one donor. **(B)** The percentage of NKG2A⁺ (left
552 panel), CD158b⁺ (middle panel) and CD158a⁺ (right panel) CD56^{dim} cells on unstimulated
553 (unstim) and stimulated NK cells with anti-CD16 (3G8), rituximab (RTX) and trastuzumab
554 (TTZ) obtained from 8 donors is shown. **(C)** Ratio of the percentage of cells expressing a
555 given IR (NKG2A (◇), CD158b (□) et CD158a (Δ)) within each subpopulation of responding
556 cells divided by the percentage of cells expressing this IR in the total CD56^{dim} of stimulated
557 NK cells of the donor. NK cells were stimulated with 3G8 (upper panel), RTX (middle panel)
558 and TTZ (lower panel). *** $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.5$
559

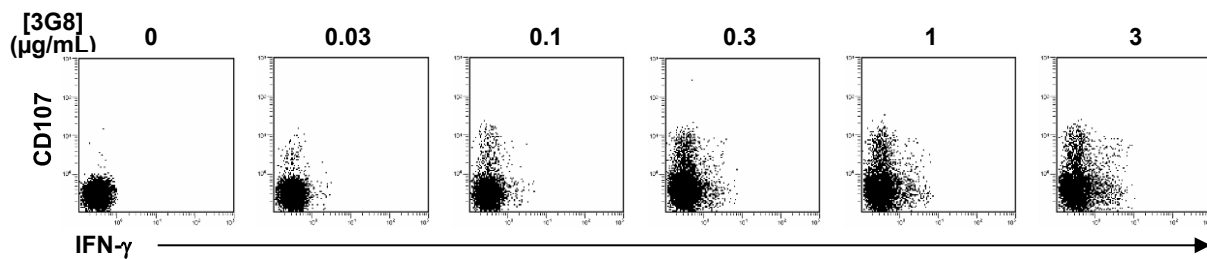
560 **Supplementary Figure: Correlation between the percentage of degranulating and IFN- γ**
561 **producing NK cells after Fc γ RIIIa engagement by 3G8 or RTX.** The estimated regression
562 lines with the correlation coefficient (R^2 value) are shown for 3G8 (left panel) and RTX (right
563 panel) stimulation according to Fc γ RIIIa V158F polymorphism. The genotype of 18 among
564 the 26 donors of figure 2 is indicated.

FIGURE 1

A



B



C

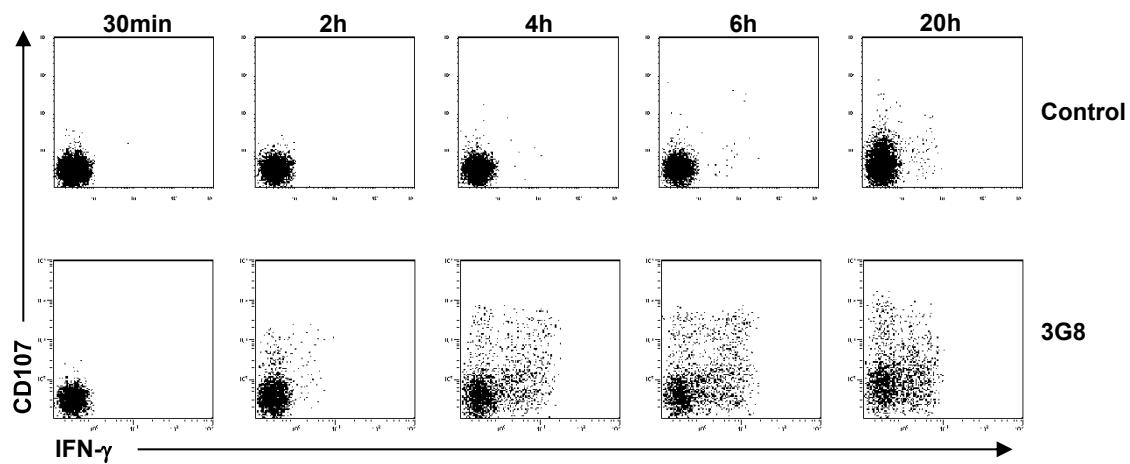
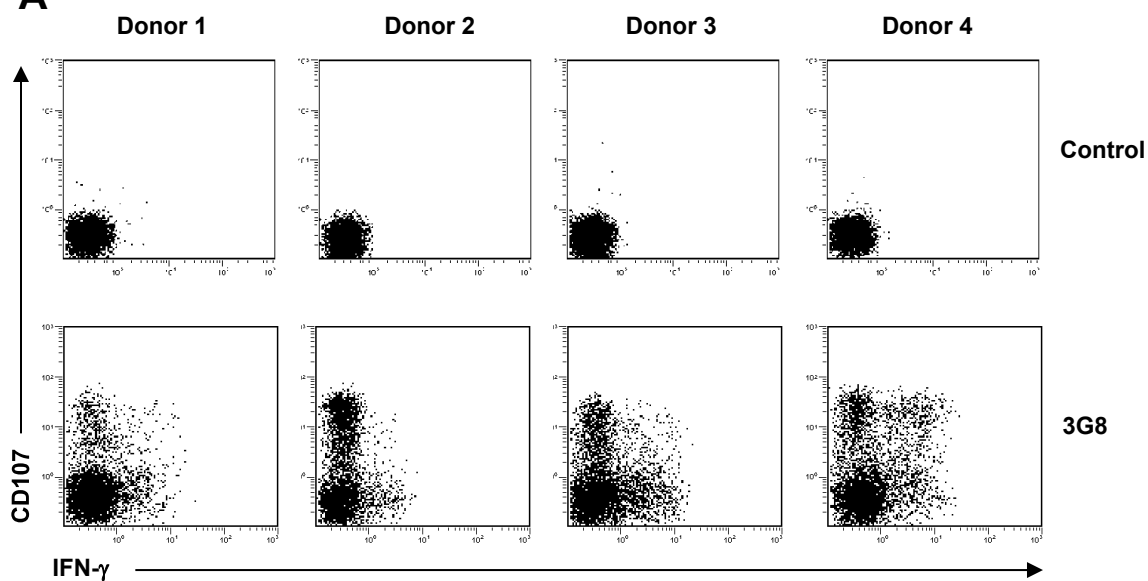
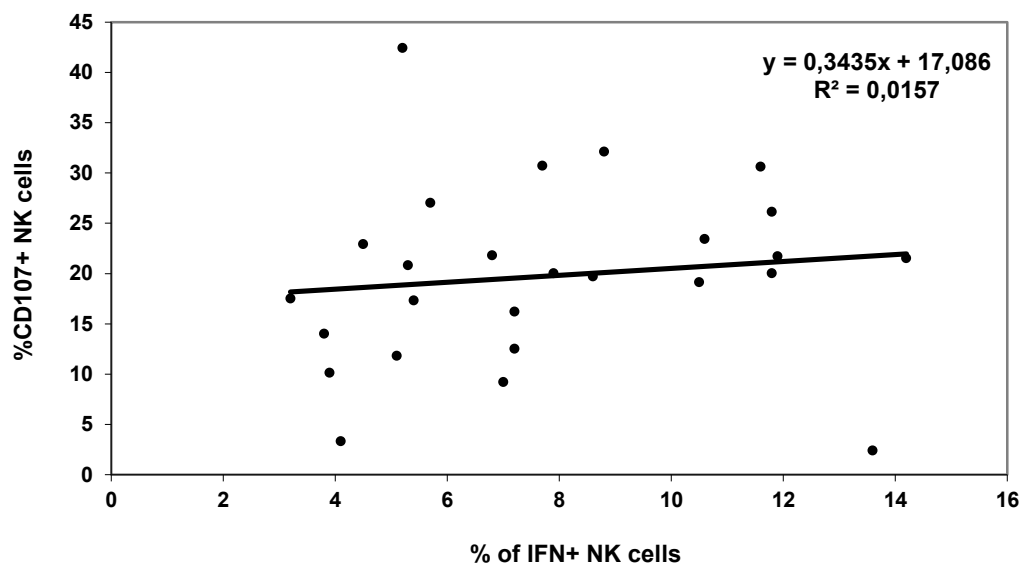


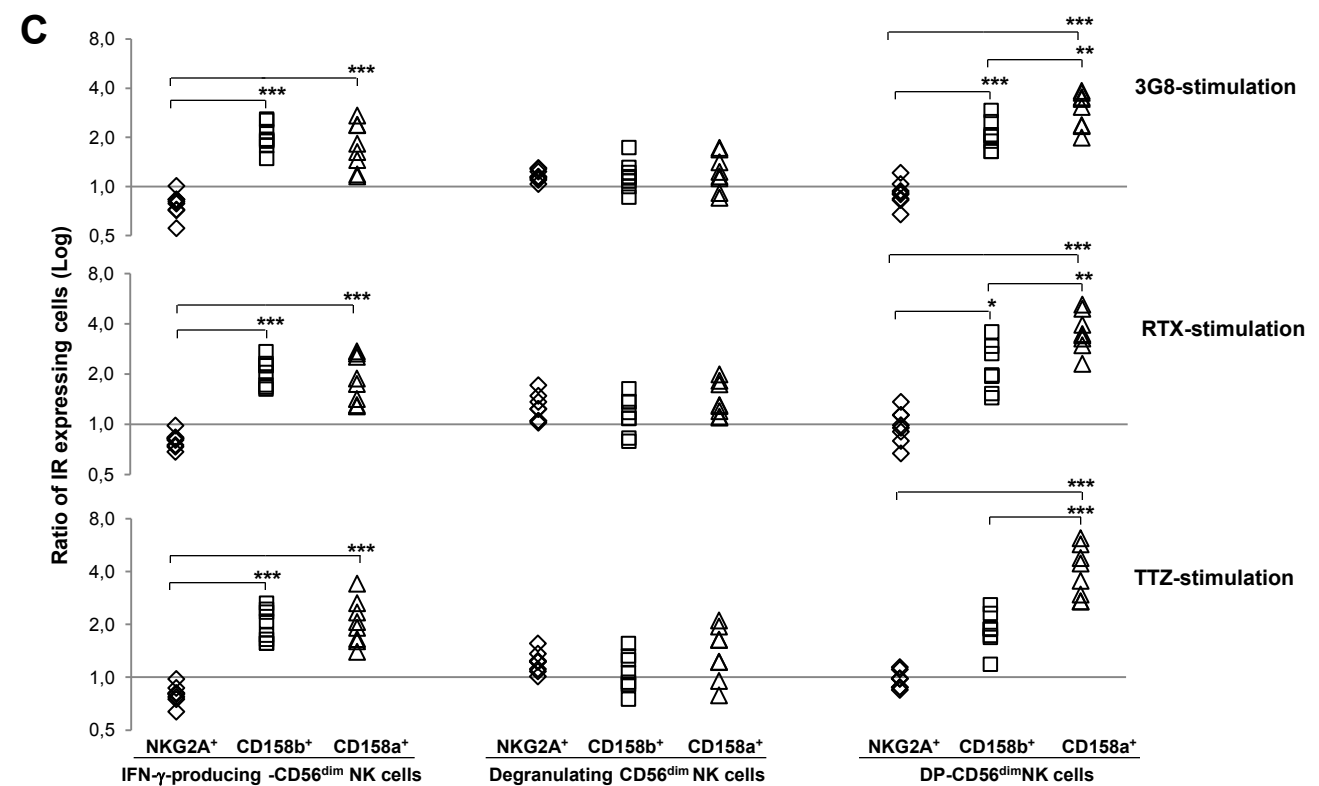
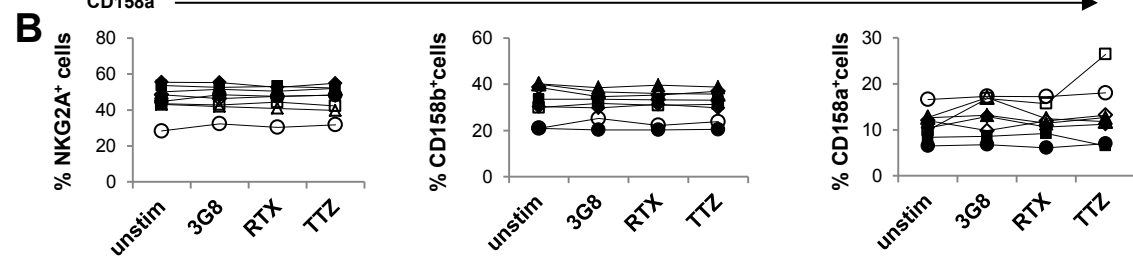
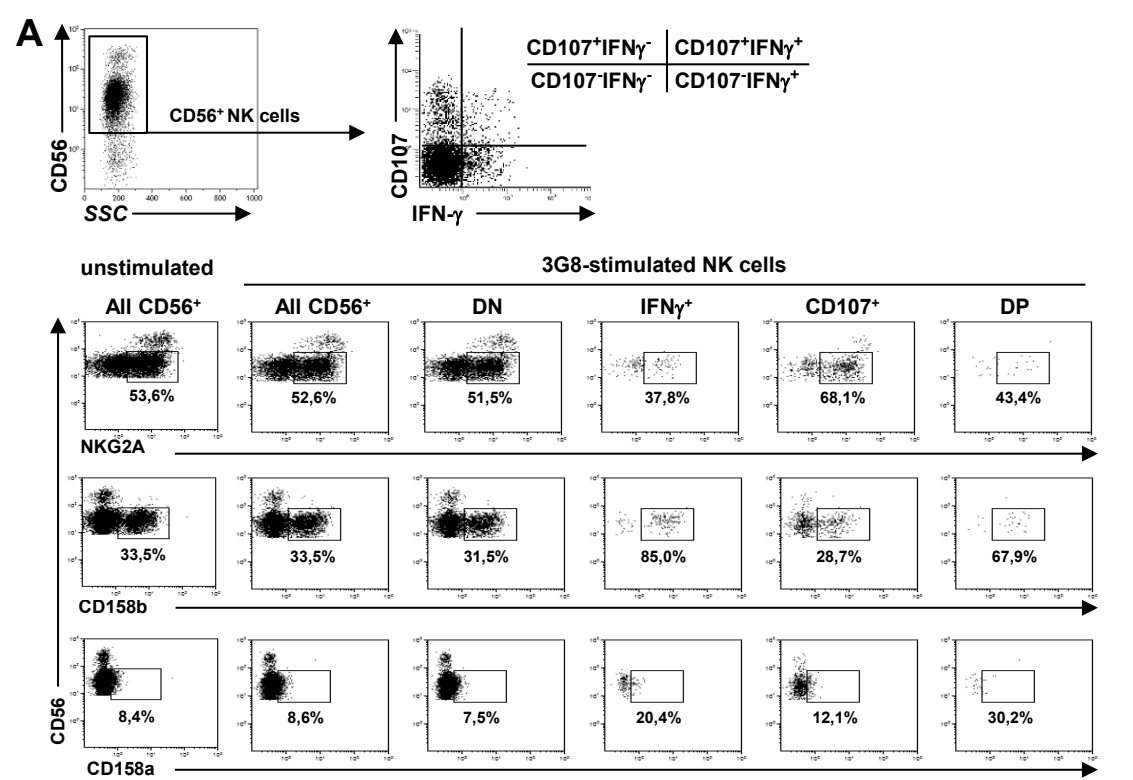
FIGURE 2

A

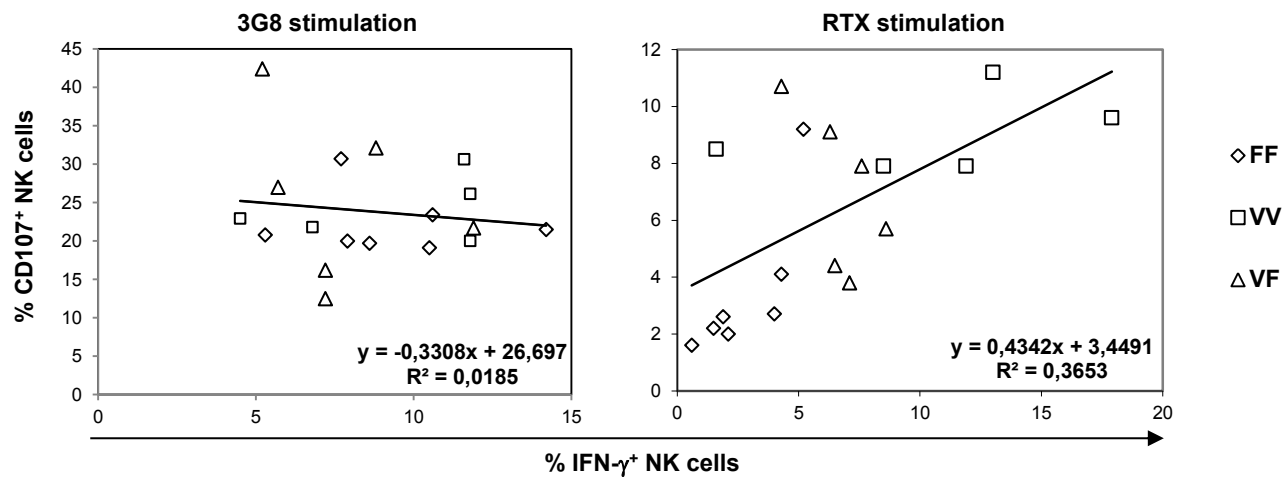


B





SUPPLEMENTARY FIGURE



Résultats complémentaires de l'Article n°2 :

Les réponses fonctionnelles des cellules NKCD56^{dim} activées par l'engagement de leurs récepteurs activateurs NKG2D, NKp30, NKp46 et 2B4 sont également influencées par l'expression des récepteurs inhibiteurs.

Introduction

Les précédents résultats montrent que lorsque le FcγRIIIA/CD16A est engagé à surface des cellules NK CD56^{dim} par un Ac anti-CD16 (3G8) ou par la portion Fc du rituximab ou du trastuzumab, la production à la production d'IFN-γ est associée à l'expression des KIRs mais pas à celle du NKG2A (article n°2). Cependant, les cellules NKCD56^{dim} expriment un large panel de récepteurs activateurs dont le co-engagement est nécessaire pour induire une activation cellulaire et produire les deux types de réponses fonctionnelles. Nous avons observé également une dichotomie fonctionnelle quand les cellules NKCD56^{dim} étaient activées par le co-engagement de leurs récepteurs activateurs. Toutefois, l'engagement de NKG2D+NKp30+NKp46+2B4 était la stimulation la plus efficace pour induire de manière importante les deux réponses fonctionnelles (article n°1, Figure 5A et Figure supplémentaire 1A). Ainsi, l'expression des récepteurs inhibiteurs NKG2A, CD158a et CD158b a été évaluée à la surface des cellules NK CD56^{dim} activées par cette stimulation efficace.

Résultats

L'expression de NKG2A, CD158a et CD158b a été évaluée à la surface des cellules NK des 8 donneurs sains identiques à la précédente étude, exposées 4hrs à une stimulation par l'engagement simultané des récepteurs activateurs NKG2D, NKp30, NKp46 et 2B4 par des Ac monoclonaux adsorbés au fond d'une plaque 96 puits, selon le protocole utilisé dans l'article n°1 (Lajoie et al, 2013).

Le pourcentage des cellules NKG2A⁺, CD158b⁺ et CD158a⁺ au sein des différentes populations de cellules NK CD56^{dim} a été obtenu avant et après stimulation pour les 8 donneurs (comme décrit dans l'article n°2) montrant encore une fois une grande variabilité intra- et interindividuelle de l'expression des récepteurs inhibiteurs. Il est à noter que le pourcentage de cellules NKG2A⁺, CD158b⁺ et CD158a⁺ obtenu pour les 8 donneurs n'évolue

pas avant et après stimulation au sein des cellules NK CD56^{dim}. À l'inverse, il est significativement différent selon la population NK CD56^{dim} répondeuse (Figure 19 A, B et C). Quelque soit le donneur, les cellules NKCD56^{dim} qui répondent par la dégranulation (cellules CD107a⁺ strictes) sont fortement enrichies en cellules NKG2A⁺ ($P < 0.001$) (Figure 19D panel du milieu) tandis que les cellules NKCD56^{dim} qui produisent de l'IFN- γ (cellules IFN- γ ⁺ strictes) sont significativement enrichies en cellules KIR⁺ (CD158b : stim vs IFN γ ⁺, $P < 0.001$ et CD158a : stim vs IFN γ ⁺, $P < 0.01$) (Figure 19D, panel de gauche). Il en est de même pour les cellules NKCD56^{dim} capables de répondre par les deux types de fonctions effectrices (DP) ($P < 0.001$) (Figure 19D, panel de droite). Ainsi, lorsque les cellules NK CD56^{dim} sont activées par l'engagement de leurs récepteurs activateurs, indépendamment de l'engagement du récepteur Fc γ RIIIA/CD16A, les cellules qui dégranulent sont majoritairement recrutées au sein des cellules NKG2A⁺ tandis que celles qui produisent de l'IFN- γ sont majoritairement recrutées parmi les cellules CD158⁺.

Discussion

Bien que le « *Licensing* » des cellules NK soit variable selon le mode de stimulation cellulaire initial, d'après la théorie de l'éducation, les cellules NK ont la nécessité d'exprimer les récepteurs inhibiteurs correspondant à leurs phénotypes HLA de classe I pour pouvoir fournir une réponse effectrice. Les résultats présentés ci-dessus suggèrent que les réponses effectrices des cellules NK induites par l'engagement de leurs récepteurs activateurs NKG2D, NKp30, NKp46 et 2B4 dépendent, comme celles induites par l'engagement du Fc γ RIIIA/CD16A, de l'expression des récepteurs inhibiteurs. Les résultats obtenus pour les récepteurs KIR (CD158b et a) ont confirmé ceux obtenus précédemment (article n°2) suggérant qu'ils éduqueraient préférentiellement les cellules NK pour qu'elles produisent de l'IFN- γ comme cela a été rapporté précédemment après stimulation par des cellules cibles (Foley et al., 2011). Tandis que le récepteur NKG2A serait préférentiellement associé à la dégranulation lorsque les cellules NK sont activées par le co-engagement de leurs récepteurs activateurs. En ont montré que l'expression des KIR n'étaient pas favorable stimulation des cellules NK par la combinaison d'IL12+IL-18 n'était pas favorable à la production d'IFN- γ . Ainsi, les conditions de stimulation apparaissent importantes pour l'orientation fonctionnelle. L'éducation fonctionnelle des NK semble s'acquérir en réponse à une stimulation donnée. L'association de l'expression des récepteurs inhibiteurs et des réponses fonctionnelles des cellules NK CD56^{dim} doit toutefois être confirmée sur un nombre de donneurs plus important.

Il serait également intéressant d'analyser l'expression du NKG2A, du CD158b, du CD158a et des autres récepteurs inhibiteurs au sein des différentes populations de cellule NK CD56^{dim} en fonction du phénotype HLA-I.

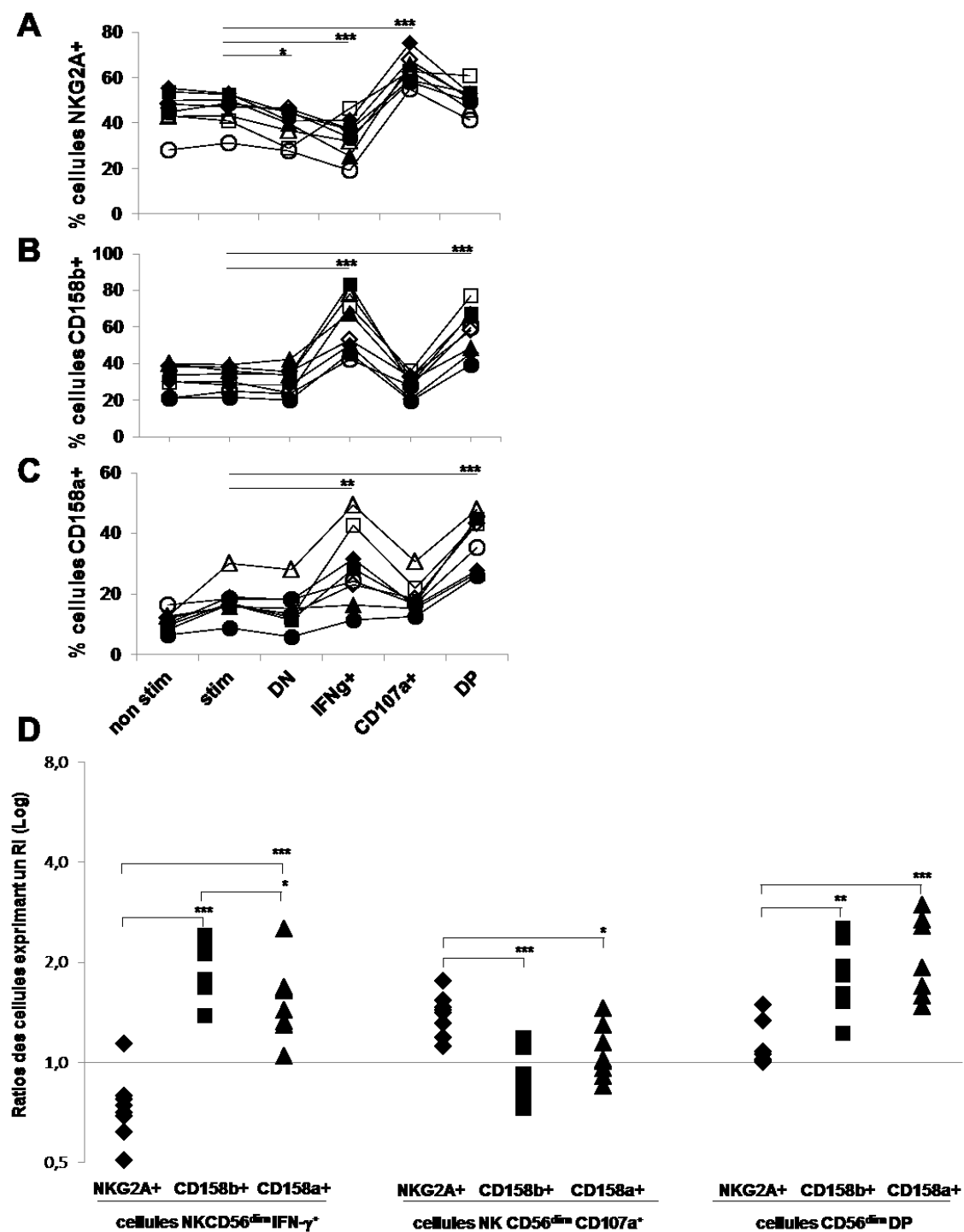


Figure 19: Relation entre l'expression des récepteurs inhibiteurs NKG2A, CD158b et CD158a et réponses fonctionnelles des cellules NK CD56^{dim} de 8 donneurs sains avant et après stimulation par l'engagement de leurs récepteurs activateurs NKG2A, NKp30, NKp46 et 2B4. Les cellules NK fraîchement purifiées ont été incubées 4hrs à 37°C dans une plaque de culture 96 puits sensibilisée par un mélange d'AcMo ciblant les récepteurs activateurs NKG2D, NKp30, NKp46 et 2B4. Pourcentage individuel des différentes populations de cellules NK NKG2A⁺ (A), CD158b⁺ (B) et CD158a⁺ (C) au sein des différentes population de cellules NK CD56^{dim}, *i.e.* le pourcentage de cellules avant stimulation (non stim), après stimulation (stim), cellules non répondeuses (DN : *Double Négative*), répondant exclusivement par la production d'IFN- γ (IFN- γ ⁺), exclusivement par la dégranulation (CD107a⁺), par les deux types de réponse (DP : *Double Positive*) (n=8) (D) Représentation des Ratios correspondant aux pourcentages des cellules NKG2A⁺, CD158b⁺ ou CD158a⁺ au sein des cellules NK CD56^{dim} répondeuses par rapport au pourcentage de cellules NKG2A⁺, CD158b⁺ ou CD158a⁺ au sein des cellules NK CD56^{dim} totales. Les analyses des différences statistiques entre les populations de cellules CD56^{dim} ont été obtenues par comparaison multiple (test ANOVA sur mesures répétées avec correction de Bonferroni). ***P<0,001 ; **P<0,05 ; *P<0,01.

Troisième partie : Étude in vitro de l'effet d'une immunocytokine sur les fonctions effectrices des cellules NK humaines. (Travail collaboratif)

Article n°3:

Highly potent anti-CD20-RLI immunocytokine targeting established human B lymphoma in SCID mouse

Vincent M, Teppaz G, **Lajoie L**, Solé V, Bressard A, Loisel S, Béchard D, Clémenceau B, Thibault G, Garrigue-Antar L, Jacques Y, Quéméner A. *MAbs*. 2014

Introduction

L'équipe de l'UMR892 du centre de recherche en cancérologie Nantes/Anger a souhaité utilisé les propriétés bénéfiques de l'IL15 dont la trans-présentation comme adjuvant des stratégies immunothérapeutiques anti-tumorales utilisant les Ac monoclonaux thérapeutiques. Elle a ainsi développé différents modèles tumoraux murins pour l'étude *in vivo* d'une molécule de fusion dans laquelle le récepteur IL-15R α est lié à une molécule d'IL15 par l'intermédiaire d'un linker (la molécule RLI), mimant ainsi le mécanisme de trans-présentation (Mortier et al., 2006). Cette molécule de fusion aurait une meilleure activité agoniste antitumorale *in vitro* et *in vivo* que celle observé avec l'IL-15 libre soluble (Bouchaud et al., 2008), entraînerait une importante prolifération des cellules mémoires TCD8 $^{+}$, NK et NKT *in vitro* et *in vivo* (Rubinstein et al., 2006; Stoklasek et al., 2006; Bessard et al., 2009) et favoriserait enfin la mobilisation et l'expansion des cellules NK (Wang et al., 2012). Ainsi cette équipe a pour objectif de déterminer si la molécule RLI couplée avec un anticorps anti-CD20, le rituximab, sous forme d'immunocytokine (ICK) aurait un effet thérapeutique significativement meilleur *in vitro* et *in vivo* que celui du rituximab.

Au sein de notre laboratoire, nous disposons d'un système permettant d'évaluer, en absence de cellules cible, les réponses fonctionnelles des cellules NK stimulées par des anticorps fixés sur un support solide. Nous avons ainsi, en collaboration avec cette équipe, évalué l'efficacité *in vitro* de l'ICK, anti-CD20-RLI. Nous avons plus particulièrement comparé les résultats obtenus pour le RLI seul, le Rituximab seul, le Rituximab combiné au RLI et l'ICK en réalisant l'étude 1) de la fixation de la partie Fc sur le Fc γ RIIIA/CD16A des cellules NK et 2) des réponses fonctionnelles des cellules NK.

Résultats et discussion

La fixation de l'anti-CD20-RLI et du rituximab sur le récepteur Fc γ RIIIA/CD16A des cellules NK92 transfectées par le CD16 humain ont été comparé par une méthode permettant de mesurer l'inhibition de la fixation de l'anticorps monoclonal anti-CD16 clone 3G8 aux cellules NK92CD16 $^{+}$. Les résultats ont montré une inhibition à hauteur de 80% pour l'anti-CD20-RLI, le rituximab seul ou en association avec le RLI (Figure 3B de l'article n°3). Ainsi, le rituximab et l'immunocytokine n'ont révélé aucune différence de liaison de leur portion Fc au récepteur Fc γ RIIIA/CD16A montrant que le couplage du RLI sur la portion Fc de l'anti-

CD20 n'affecte pas son interaction avec le FcγRIIIA/CD16A membranaire. De plus, les résultats *in vitro* obtenus concernant la perte d'expression membranaire et de capacité de dégranulation des cellules NK fraîchement isolées de trois donneurs sains ont montré que l'anti-CD20-RLI induisait 2 à 3 fois plus de modulation du FcγRIIIA/CD16A (Figure 7A de l'article n°3) ainsi que de dégranulation (Figure 7B de l'article n°3) que le rituximab suggérant un effet potentialisant de l'immunocytokine *in vitro*. L'effet de l'ICK est comparable à celui obtenu pour le rituximab combiné au RLI confirmant le potentiel agoniste et bénéfique de l'IL15 et plus particulièrement du RLI sur le mécanisme d'ADCC précédemment observé *in vitro*.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les cellules NK CD56^{dim} FcγRIIIA⁺ jouent un rôle important dans le système immunitaire inné, mais également en tant que régulateurs de la réponse adaptative par l'intermédiaire d'interactions cellulaires et de signaux cytokiniques. En outre, les réponses effectrices des cellules NK CD56^{dim} dépendantes du récepteur FcγRIIIA telles que la forte capacité cytotoxique par le mécanisme d'ADCC et leur aptitude à produire d'importantes cytokines dont l'IFN-γ, une cytokine aux propriétés antivirale, antiproliférative, anti-tumorale et immunomodulatrice, rend leur étude importante dans le champ actuel de recherche sur les mécanismes d'action des anticorps thérapeutiques. De ce fait, une meilleure compréhension des interactions existantes entre les anticorps monoclonaux et les cellules NKCD16⁺, et l'identification des facteurs qui pourraient influencer la fonctionnalité de ces cellules effectrices sont des points essentiels à approfondir afin d'optimiser ou d'améliorer l'efficacité thérapeutique des anticorps monoclonaux dans les stratégies anti-tumorales.

Les cellules CD56^{dim} ont longtemps été uniquement associé à la cytotoxicité qu'elle soit naturelle ou dépendante des anticorps notamment du fait de nombreuses études suggèrent que les cellules NK CD56^{bright} pourraient être les cellules précurseurs des cellules NK CD56^{dim} (Freud et al., 2005; Chan et al., 2007; Romagnani et al., 2007; Huntington et al., 2009; Hamann et al., 2011). Cette hypothèse repose sur les analyses phénotypiques et fonctionnelles de ces deux sous-populations majeures de cellules NK. En effet, le récepteur NKG2A fortement exprimé par les cellules NKCD56^{bright} disparaît progressivement au profit de l'acquisition des récepteurs KIR fortement exprimés par les cellules CD56^{dim}. De plus, le CD57, un marqueur de maturation cellulaire, est exprimé exclusivement à la surface des cellules NKCD56^{dim} et est corrélé à l'expression positive des récepteurs KIRs suggérant que la perte d'expression du récepteur NKG2A et l'acquisition séquentielle des récepteurs KIRs et du CD57 reflète un processus de différenciation continu des cellules CD56^{bright} en CD56^{dim} (Björkström et al., 2010). D'un point de vue fonctionnel, les cellules CD56^{bright} ont de forte capacité de production de cytokines en réponse à une stimulation par des monokines, contrairement aux cellules CD56^{dim} qui produisent peu de cytokines en réponses aux monokines mais sécrètent d'importante quantité d'IFN-γ en en réponse à une stimulation par les cellules cibles (Korbel et al., 2005; Anfossi et al., 2006; Fauriat et al., 2010b). Ainsi, l'éducation des cellules NK dépendantes des récepteurs KIR régulerait les réponses cytotoxiques en réponses aux cellules cibles mais n'aurait pas d'effet sur la sécrétion d'IFN-

γ après une stimulation cytokinique (Björkström et al., 2010). Nos résultats ont montré que la dichotomie fonctionnelle existante au sein des cellules NK CD56^{dim} activées par l'engagement du récepteur Fc γ RIIIA dépend des donneurs et est associée à l'expression des récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH de classe I. Toutefois, les conditions de stimulation ont la capacité d'influencer les réponses fonctionnelles des cellules NK. En effet, nous avons observé que la ségrégation fonctionnelle des cellules NK CD56^{dim} induites par le co-engagement des récepteurs activateurs NKG2D, le NKp30, NKp46 et le 2B4 est associée à une famille de récepteur inhibiteur particulier. Les cellules NKCD56^{dim} répondant par la production d'IFN- γ sont majoritairement recrutées au sein des cellules KIR⁺ tandis que les cellules NKCD56^{dim} qui dégranulent sont majoritairement recrutées au sein des cellules NKG2A⁺. Bien que dans les conditions de stimulation où plusieurs récepteurs activateurs sont engagés, l'hétérogénéité fonctionnelle peut également s'expliquer par le nombre de récepteurs activateurs engagés selon le modèle du rhéostat, l'orientation fonctionnelle des cellules NK ne semble pas dépendre exclusivement de l'expression des KIR ou de leur maturation mais également des conditions de stimulation. De plus, Li et al., ont proposé que l'état de phosphorylation du motif « RSSTR » située dans le domaine cytoplasmique du récepteur Fc γ RIIIA, induite par l'engagement du récepteur pourrait conditionner les réponses fonctionnelles, i.e la dégranulation et la production de cytokines. Ainsi, le récepteur phosphorylé entraîne un flux calcique, une phosphorylation de syk et une production de cytokine plus importante. A l'inverse, lorsque le récepteur n'est pas phosphorylé, il active plus efficacement la voie Gab2/PI3K permettant d'augmenter la dégranulation (Li et al., 2012)

Nos résultats ont montré que, d'un point de vue physiologique, l'acquisition des récepteurs KIRs impliqués dans l'éducation fonctionnelle est associée à la maturation des cellules NK et à la production d'IFN- γ dépendante de l'engagement du récepteur Fc γ RIIIA. Notre équipe s'intéresse, d'une part, aux interactions existantes entre les anticorps monoclonaux et les cellules effectrices exprimant ces récepteurs Fc γ R et d'autre part, aux facteurs génétiques et non génétiques qui influencent la réponse clinique. Il semble donc nécessaire de confronter nos résultats avec les possibilités de perspectives liées aux anticorps thérapeutiques.

Parmi les facteurs qui influencent la réponse clinique, nous avons précédemment cités le polymorphisme Fc γ RIIIA-V158F. D'un point de vue fonctionnel, l'incubation des IgG avec des cellules NK provenant de donneurs homozygotes VV entraînent un flux calcique

intracellulaire plus important et une induction de l'apoptose plus rapide qu'en présence de cellules NK de donneurs homozygotes FF (Wu et, 1997). De plus, notre équipe a montré pour la première fois l'impact de ce polymorphisme V158F sur la réponse clinique. Ainsi, dans le cas du rituximab les résultats montrant que l'allotype 158V a une meilleure affinité pour les IgG que l'allotype 158F et une meilleure relation concentration-effet de l'ADCC (Dall'Ozzo, 2004) et que les patients homozygotes pour l'allèle V présentent une meilleure réponse que les patients porteurs de l'allèle F dans le lymphome malins non hodgkiniens (Cartron, 2002) a été confirmée depuis par d'autres équipes notamment pour d'autres anticorps tels que le trastuzumab, l'infliximab et le cetuximab et ainsi dans le cadre d'autres pathologies (Anolik et al., 2003; Treon et al., 2005; Louis et al., 2004; Varchetta et al., 2007; Musolino et al., 2008; Bibeau et al., 2009; Calemme et al., 2012; Moroi et al., 2013). L'optimisation de la portion Fc des anticorps monoclonaux thérapeutiques n'a cessé de croître avec cette découverte innovante afin de potentialiser l'interaction des deux partenaires. Ainsi différentes approches ciblant la portion Fc de l'IgG ont été développées afin d'augmenter son affinité pour les FcγR et ainsi le recrutement cellulaire. La première approche consiste à muter la séquence codante de l'anticorps au niveau de la région d'interactions des deux molécules. Ainsi des mutants du trastuzumab et du rituximab ont été produits et les résultats ont montré que ces anticorps ainsi mutés présentés une phagocytose augmentée (Richards et al., 2008) et une augmentation des capacités cytolytiques *in vitro* et *in vivo* (Stavenhagen et al., 2007; Lazar et al., 2006). Toutefois, ces mutations pourraient engendrer des problèmes d'immunogénicité. La deuxième approche repose sur la glyco-ingénierie des anticorps. La modification du N-glycane (Asn297 du domaine CH2) situé dans la portion Fc des IgG1 entraîne une modification de conformation et donc d'affinité. Il a été montré que l'absence de fucose était un facteur favorisant la liaison des IgG1 aux FcγRs (Jefferis and Lund, 2002; Shields et al., 2001). *In vitro*, les anticorps afucosylés anti-CD20 développés par les firmes pharmaceutiques présentent une ADCC médiée par les cellules NK considérablement augmentée par rapport à l'ADCC médiée par le rituximab (de Romeuf et al., 2008). C'est le cas notamment de l'obinituzumab ou GA101, qui a montré une potentialisation de l'ADCC (Mössner et al., 2010) et est actuellement en phase III pour des essais dans le traitement de lymphome non hodgkinien et de lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB). Cependant, en plus du polymorphisme V158F, le gène *FCGR3A* est soumis à des variations de nombre de copie (CNV, Copy Number Variation) pouvant également influencer les réponses biologiques dépendante du FcγRIIIA/CD16A. Breunis et al, ont mis en évidence que les individus n'ayant

qu'une seule copie de *FCGR3A* présentent une expression plus faible de FcγRIIIA/CD16A à la surface des cellules NK et semblent avoir une capacité cytolytique diminuée par rapport aux individus ayant deux ou trois copies (Breunis et al., 2009). Ainsi, cette variabilité doit également être prise en compte dans l'étude des réponses effectrices dépendantes du FcγRIIIA/CD16A afin de pouvoir améliorer l'efficacité de traitement chez des patients présentant qu'une seule copie de *FCGR3A* et soumis à un traitement par des anticorps monoclonaux thérapeutiques.

Actuellement, les développements s'orientent vers la génération d'immunocytokine correspondant au couplage d'une cytokine à la portion Fc de l'anticorps monoclonal thérapeutique agissant alors comme un adjuvant. Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu participer à un travail collaboratif visant à évaluer l'intérêt thérapeutique du rituximab couplé au niveau de la portion Fc à la protéine de fusion RLI, un complexe de fusion de la forme soluble de IL-15Rα humain attaché par un lien peptidique à l'IL-15 humaine, mimant ainsi le mécanisme de cross-présentation. J'ai ainsi pu montrer la potentialisation *in vitro* de l'ADCC et de l'activation cellules NK induite par l'immunocytokine et le rituximab combiné avec le RLI. En plus des immunocytokines, parmi les nouvelles générations d'anticorps visant à améliorer l'activité cytotoxique des cellules NK, on retrouve les anticorps bispécifiques tels que les BIKes (BIspecific Killer Engagers) basé sur la construction de deux chaînes scFv (single chain Fragment variable) reliées entre elles. L'une dirigée contre le CD16 et l'autre contre l'antigène spécifique de la tumeur tel que le « CD16xCD33 BIKE » ciblant les cellules myéloïdes malignes dans le traitement des syndromes myelodysplasiques et les leucémies aiguës myéloïdes. Cet anticorps a notamment montré qu'il augmentait à la fois l'ADCC et la production de cytokines (Gleason et al., 2012). De plus, l'inhibition d'ADAM17 augmenterait l'effet de cet anticorps (Wiernik et al., 2013). En effet, nous et d'autres avons montré qu'ADAM17, une métalloprotéase dépendante de zinc, était impliquée dans le décapage du récepteur FcγRIIIA/CD16A après activation cellulaire (Romee et al, 2013, Lajoie et al, 2014). Il semble donc intéressant dans les stratégies anti-cancéreuses visant à potentialiser les réponses fonctionnelles des cellules NK CD56^{dim} FcγRIIIA⁺, de préserver la présence du récepteur en surface après son engagement. Compte tenu du fait qu'ADAM17 est impliquée également dans la régulation de nombreuses protéines membranaires telles que le CD62-L, une molécule d'adhésion cellulaire nécessaire à la domiciliation des lymphocytes vers les organes lymphoïdes secondaires (Gallatin et al., 1983) et dans l'orientation des polynucléaires neutrophiles vers les sites de l'inflammation (Jutila et al., 1989), il semble périlleux d'utiliser

un inhibiteur de l'enzyme afin de potentialiser les réponses fonctionnelles dépendante du FcγRIIIA des cellules NK sans affecter d'autres mécanismes biologiques importants pour le bon fonctionnement de la réponse immunitaire. Notre équipe ayant identifié, pour la première fois au niveau moléculaire, le site de clivage spécifique du récepteur FcγRIIIA/CD16A dépendant d'ADAM17 entre l'alanine 195 et la valine 196. Nous avons ainsi tentés en transfectant des cellules NK92 par un FcγRIIIA contenant dans sa séquence une inversion des deux acides aminés issus du site de clivage d'obtenir une lignée cellulaire exprimant un FcγRIIIA potentiellement non clivable afin de limiter la régulation négative due à sa modulation membranaire. Néanmoins, nos résultats ont révélé l'insuffisance d'une telle approche pour empêcher la modulation du récepteur membranaire. En revanche, Romee et son équipe ont montré que l'utilisation de l'inhibiteur, BMS566394, spécifique d'ADAM17 empêche le clivage du récepteur FcγRIIIA à la surface des cellules NK augmentant ainsi la production de cytokines telles que l'IFN-γ et le TNF-α ainsi que de façon moindre l'ADCC des cellules B, Raji, opsonisées par un anticorps anti-CD20 (Romee et al., 2013). Toutefois, bien que l'inhibition d'ADAM17 semble influencer de manière favorable les réponses effectrices dépendantes du FcγRIIIA/CD16A, la modulation du récepteur dépendant d'ADAM17 n'est pas un mécanisme exclusif lorsque le récepteur est engagé à la surface des cellules NK. En effet, nous avons également montré que l'engagement du récepteur FcγRIIIA/CD16A pouvait entraîner son internalisation. Toutefois nous ignorons si les autres récepteurs activateurs des cellules NK sont également internalisés ou clivés après leur engagement dans nos conditions de stimulation. Cette modulation pourrait entraîner un état d'anergie cellulaire. La cellule NK pourrait alors ne plus être fonctionnelle ou avoir une fonctionnalité globale modifiée selon les récepteurs activateurs modulés. Par la même méthode et approche de cytométrie en flux que nous avons mis en place, il serait alors intéressant d'évaluer simultanément les réponses fonctionnelles et l'expression des autres récepteurs activateurs à la surface des cellules activées par l'engagement du FcγRIIIA/CD16A.

L'ensemble des études menées afin d'améliorer l'effet clinique sont toutefois focalisées uniquement sur l'optimisation des anticorps thérapeutique dans le but d'augmenter l'ADCC des cellules NK et négligent ainsi la capacité de production de cytokines de ces effecteurs. Hors nos résultats ont dévoilé que la production d'IFN-γ est un élément majeur de réponse des cellules NK. Et plus particulièrement, ils montrent pour la première fois que la production d'IFN-γ dépendante de l'engagement du FcγRIIIA est associée à la présence d'un récepteur

inhibiteur KIR (CD158a ou CD158b) à la surface des cellules NKCD56^{dim} stimulées par un anticorps anti-CD16 ou par des anticorps monoclonaux thérapeutiques mais pas à la présence du NKG2A. Par conséquent, si l'expression des récepteurs inhibiteurs est associée à l'orientation des réponses fonctionnelles des cellules NK et plus particulièrement celles dépendantes du FcγRIIIA/CD16A, elle pourrait être étudiée pour évaluer leur valeur prédictive de la réponse clinique chez les patients traités par des anticorps monoclonaux thérapeutiques. Toutefois, il faut prendre en considération que lorsque les cellules NKCD56^{dim} sont activées par l'engagement du FcγRIIIA/CD16A par la portion Fc d'un anticorps monoclonal thérapeutique tels que le rituximab ou le trastuzumab, la variabilité des réponses fonctionnelles est double. En effet, les réponses effectrices sont influencées par l'affinité de l'anticorps pour le récepteur et donc par le polymorphisme du *FCGR3A*. Cependant, l'ensemble de nos résultats montrent que les cellules CD56^{dim} qui produisent de l'IFN-γ après l'engagement du FcγRIIIA sont préférentiellement recrutées au sein des cellules CD158a⁺ ou CD158b⁺ mais pas au sein des cellules NKG2A⁺. Ainsi, l'hétérogénéité de l'expression des récepteurs inhibiteurs KIRs pourrait également être impliquée dans la variabilité inter-individuelle des réponses fonctionnelles qui se traduit par la faible corrélation entre les deux réponses fonctionnelles dépendantes du FcγRIIIA/CD16A quand les cellules sont stimulées par des anticorps thérapeutiques. Bien que l'expression des récepteurs KIRs à la surface des cellules NKCD56^{dim} influence de manière favorable la production d'IFN-γ dépendant de l'engagement du FcγRIIIA/CD16A, ils interviennent également dans le contrôle de l'activation des cellules NK par l'inhibition des signaux activateurs médiés par les récepteurs activateurs. Ainsi, de nombreuses études montrent l'intérêt de l'utilisation d'anticorps monoclonal anti-KIR comme stratégie anti-tumorale. En 2008, Binyamin et al, ont montré la potentialisation des réponses fonctionnelles des cellules NK vis-à-vis de cellules B autologues infectées par le Virus Einstein Barr (EBV) par l'utilisation d'un panel d'anticorps monoclonaux bloquant les KIR, NKG2A et CD85j en combinaison au rituximab afin de simultanément réduire les signaux inhibiteurs et déclencher l'ADCC. De plus, il semblerait que l'augmentation de l'ADCC ne soit pas due à la présence des anticorps bloquant les récepteurs inhibiteurs, suggérant que d'autres mécanismes intervenant dans la tolérance cellulaire empêchent la lyse des cellules saines dans ce contexte (Binyamin et al., 2008). En 2009, Romagne et al. ont développé un anticorps humanisé bloquant uniquement les récepteurs KIR CD158a et CD158b, « IPH2101 ». Cet anticorps a à la fois bloqué l'interaction des récepteurs KIRs à leur ligands, les molécules HLA-C, et augmenté *in vitro* l'ADCC des cellules NK vis-à-vis des cellules tumorales exprimant les molécules HLA-C

mais pas vis-à-vis des cellules normales du sang (Romagné et al., 2009). Ainsi, l'utilisation d'anticorps anti-KIR comme adjuvant aux traitements anti-tumoraux semble être prometteur. Toutefois, ces stratégies sont développées encore une fois en vue d'augmenter l'ADCC des cellules NK. Qu'en est-il de la réponse IFN- γ ? Notamment, lorsque les méthodes employées visent spécifiquement le blocage des KIRs (CD158a et CD158b) pour lesquels nous avons montré qu'ils influençaient les réponses fonctionnelles dépendantes du Fc γ RIIIA/CD16A.

CONCLUSION

Ce travail de thèse a permis d'identifier le mécanisme enzymatique impliqué dans la perte d'expression membranaire du FcγRIIIA/CD16A à la surface des cellules NKCD56^{dim} activées par l'engagement ou non du récepteur. Nous montrons qu'ADAM17 est l'une des enzymes responsable de ce mécanisme et qu'elle agit exclusivement en *cis*. Nous identifions pour la première fois le site spécifique de clivage du FcγRIIIA/CD16A par l'enzyme entre l'alanine 195 et la valine 196. Cette découverte pourrait notamment permettre la conception d'inhibiteurs ou d'anticorps bloquant spécifiquement le clivage du récepteur comme stratégie alternative anti-tumorale visant à potentialiser des réponses effectrices dépendante du FcγRIIIA/CD16A. Nous montrons que le mécanisme de modulation du FcγRIIIA/CD16A dépendant d'ADAM17 est un marqueur d'activation plus fortement corrélé à la dégranulation qu'à la production d'IFN-γ lorsque le récepteur n'est pas engagé. Tandis que l'engagement de ce dernier par l'anti-CD16 3G8, induit également internalisation du récepteur. Toutefois, nos conditions expérimentales ne nous ont pas permis de déterminer la part relative de chacun des deux mécanismes. Le mécanisme de modulation dépendant d'ADAM17 impliqué dans la régulation de nombreuses protéines membranaire semble être un mécanisme général exercé au cours du processus d'activation des lymphocytes. Nous montrons que la dichotomie fonctionnelle existante au sein des cellules polyclonales NKCD56^{dim} activées par l'engagement ou non du récepteur FcγRIIIA/CD16A dépend du donneur et de l'expression des récepteurs inhibiteurs. Nous montrons pour la première fois que la production d'IFN-γ dépendant du FcγRIIIA/CD16A est associée à l'expression des KIRs. Toutefois, une importante proportion de cellules activées par l'engagement du FcγRIIIA/CD16A par un anticorps monoclonal anti-CD16 modulent leur CD16 sans avoir dégranulé ni produit d'IFN-γ suggérant que ces cellules possèdent d'autres capacités fonctionnelles non étudiée ici telle que la production de chemokines ou d'autres cytokines comme le TNF-α. Ces cellules pourraient notamment être partiellement représentées au sein des sous-populations de cellules CD56^{dim}CD62L répondant exclusivement par la dégranulation ou par la production d'IFN-γ. Malgré la variabilité interindividuelle, l'expression des récepteurs inhibiteurs semble être un marqueur associé à la réponse fonctionnelle des cellules NK. Finalement, nous montrons que l'utilisation du rituximab sous forme d'immunocytokines permet de potentialiser l'ADCC et l'activation des cellules NK. Toutefois, la production d'IFN-γ est un élément à prendre en compte dans les mécanismes d'action des anticorps monoclonaux thérapeutiques, notamment dans l'optique de privilégier la réponse fonctionnelle la plus favorable. De manière plus générale, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse a permis d'identifier de

nouveaux facteurs pouvant influencer la fonctionnalité des cellules NK et de mieux comprendre les réponses effectrices dépendantes du FcγRIIIA/CD16A qui sont essentielles afin de potentialiser l'efficacité thérapeutique des anticorps monoclonaux dans les stratégies anti-tumorales.

BIBLIOGRAPHIE

Abès, R., E. Gélizé, W.H. Fridman, and J.-L. Teillaud. 2010. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood*. 116:926–34. doi:10.1182/blood-2009-10-248609.

Abeyweera, T.P., E. Merino, and M. Huse. 2011. Inhibitory signaling blocks activating receptor clustering and induces cytoskeletal retraction in natural killer cells. *J. Cell Biol.* 192:675–90. doi:10.1083/jcb.201009135.

Agagué, S., E. Marcenaro, B. Ferranti, L. Moretta, and A. Moretta. 2008. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 112:1776–83. doi:10.1182/blood-2008-02-135871.

Allan, D.S., M. Colonna, L.L. Lanier, T.D. Churakova, J.S. Abrams, S.A. Ellis, A.J. McMichael, and V.M. Braud. 1999. Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* 189:1149–56.

Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld. 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods*. 294:15–22. doi:10.1016/j.jim.2004.08.008.

Amigorena, S., and C. Bonnerot. 1999. Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and class II molecules. *Semin. Immunol.* 11:385–90. doi:10.1006/smim.1999.0196.

Amigorena, S., J. Salamero, J. Davoust, W.H. Fridman, and C. Bonnerot. 1992. Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. *Nature*. 358:337–41. doi:10.1038/358337a0.

Anderson, D.M., S. Kumaki, M. Ahdieh, J. Bertles, M. Tometsko, A. Loomis, J. Giri, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, and N.A. Jenkins. 1995. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.* 270:29862–9.

Andersson, S., C. Fauriat, J.-A. Malmberg, H.-G. Ljunggren, and K.-J. Malmberg. 2009. KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. *Blood*. 114:95–104. doi:10.1182/blood-2008-10-184549.

Anfossi, N., P. André, S. Guia, C.S. Falk, S. Roetynck, C.A. Stewart, V. Bresó, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, F. Romagné, S. Ugolini, and E. Vivier. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 25:331–42. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013.

Angelini, D.F., G. Borsellino, M. Poupot, A. Diamantini, R. Poupot, G. Bernardi, F. Poccia, J.-J. Fournié, and L. Battistini. 2004. FcγRIII discriminates between 2 subsets of Vγ9Vδ2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood*. 104:1801–7. doi:10.1182/blood-2004-01-0331.

Anolik, J.H., D. Campbell, R.E. Felgar, F. Young, I. Sanz, J. Rosenblatt, and R.J. Looney. 2003. The relationship of FcγRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48:455–9. doi:10.1002/art.10764.

Arnold, V., J.-S. Cummings, U.Y. Moreno-Nieves, C. Didier, A. Gilbert, F. Barré-Sinoussi, and D. Scott-Algara. 2013. S100A9 protein is a novel ligand for the CD85j receptor and its interaction is implicated in the control of HIV-1 replication by NK cells. *Retrovirology*. 10:122. doi:10.1186/1742-4690-10-122.

Arnon, T.I., H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, A. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D.G. Wolf, and O. Mandelboim. 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* 6:515–23. doi:10.1038/ni1190.

Assarsson, E., T. Kambayashi, J.D. Schatzle, S.O. Cramer, A. von Bonin, P.E. Jensen, H.-G. Ljunggren, and B.J. Chambers. 2004. NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions. *J. Immunol.* 173:174–80.

Bahram, S., H. Inoko, T. Shiina, and M. Radosavljevic. 2005. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr. Opin. Immunol.* 17:505–9. doi:10.1016/j.coi.2005.07.016.

Bar-On, Y., A. Glasner, T. Meningher, H. Achdout, C. Gur, D. Lankry, A. Vitenshtein, A.F.A. Meyers, M. Mandelboim, and O. Mandelboim. 2013. Neuraminidase-mediated, NKp46-dependent immune-evasion mechanism of influenza viruses. *Cell Rep.* 3:1044–50. doi:10.1016/j.celrep.2013.03.034.

Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 285:727–9.

Beano, A., E. Signorino, A. Evangelista, D. Brusa, M. Mistrangelo, M.A. Polimeni, R. Spadi, M. Donadio, L. Ciuffreda, and L. Matera. 2008. Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *J. Transl. Med.* 6:25. doi:10.1186/1479-5876-6-25.

Bergin, D.A., E.P. Reeves, P. Meleady, M. Henry, O.J. McElvaney, T.P. Carroll, C. Condrón, S.H. Chotirmall, M. Clynes, S.J. O'Neill, and N.G. McElvaney. 2010. α-1 Antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8. *J. Clin. Invest.* 120:4236–50. doi:10.1172/JCI41196.

Bessard, A., V. Solé, G. Bouchaud, A. Quémener, and Y. Jacques. 2009. High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.* 8:2736–45. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0275.

Beum, P. V., M.A. Lindorfer, F. Beurskens, P.T. Stukenberg, H.M. Lokhorst, A.W. Pawluczko, P.W.H.I. Parren, J.G.J. van de Winkel, and R.P. Taylor. 2008. Complement

activation on B lymphocytes opsonized with rituximab or ofatumumab produces substantial changes in membrane structure preceding cell lysis. *J. Immunol.* 181:822–32.

Béziat, V., J.A. Traherne, L.L. Liu, J. Jayaraman, M. Enqvist, S. Larsson, J. Trowsdale, and K.-J. Malmberg. 2013. Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education. *Blood*. doi:10.1182/blood-2012-10-461442.

Bibeau, F., E. Lopez-Crapez, F. Di Fiore, S. Thezenas, M. Ychou, F. Blanchard, A. Lamy, F. Penault-Llorca, T. Frébourg, P. Michel, J.-C. Sabourin, and F. Boissière-Michot. 2009. Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J. Clin. Oncol.* 27:1122–9. doi:10.1200/JCO.2008.18.0463.

Bienvenu, J., R. Chvetzoff, G. Salles, C. Balter, H. Tilly, R. Herbrecht, P. Morel, P. Lederlin, P. Solal-Celigny, B. Audhuy, B. Christian, J. Gabarre, O. Casasnovas, G. Marit, C. Sebban, and B. Coiffier. 2001. Tumor necrosis factor alpha release is a major biological event associated with rituximab treatment. *Hematol. J.* 2:378–84. doi:10.1038/sj/thj/6200133.

Billadeau, D.D., J.L. Upshaw, R.A. Schoon, C.J. Dick, and P.J. Leibson. 2003. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat. Immunol.* 4:557–64. doi:10.1038/ni929.

Binyamin, L., R.K. Alpaugh, T.L. Hughes, C.T. Lutz, K.S. Campbell, and L.M. Weiner. 2008. Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy. *J. Immunol.* 180:6392–401.

Björkström, N.K., P. Riese, F. Heuts, S. Andersson, C. Fauriat, M.A. Ivarsson, A.T. Björklund, M. Flodström-Tullberg, J. Michaëlsson, M.E. Rottenberg, C.A. Guzmán, H.-G. Ljunggren, and K.-J. Malmberg. 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*. 116:3853–64. doi:10.1182/blood-2010-04-281675.

Black, R.A., J.R. Doedens, R. Mahimkar, R. Johnson, L. Guo, A. Wallace, D. Virca, J. Eisenman, J. Slack, B. Castner, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, R. Cowling, G. Jin, K. Charrier, J.J. Peschon, and R. Paxton. 2003. Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity. *Biochem. Soc. Symp.* 39–52.

Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, and D.P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 385:729–33. doi:10.1038/385729a0.

Boross, P., and J.H.W. Leusen. 2012. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am. J. Cancer Res.* 2:676–90.

Borrego, F., A. Lopez-Beltran, J. Peña, and R. Solana. 1994. Downregulation of Fc gamma receptor IIIA alpha (CD16-II) on natural killer cells induced by anti-CD16 mAb is

independent of protein tyrosine kinases and protein kinase C. *Cell. Immunol.* 158:208–17. doi:10.1006/cimm.1994.1268.

Borrego, F., M. Ulbrecht, E.H. Weiss, J.E. Coligan, and A.G. Brooks. 1998. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J. Exp. Med.* 187:813–8.

Bottino, C., R. Castriconi, D. Pende, P. Rivera, M. Nanni, B. Carnemolla, C. Cantoni, J. Grassi, S. Marcenaro, N. Reymond, M. Vitale, L. Moretta, M. Lopez, and A. Moretta. 2003. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* 198:557–67. doi:10.1084/jem.20030788.

Bouchaud, G., L. Garrigue-Antar, V. Solé, A. Quémener, Y. Boublik, E. Mortier, H. Perdreau, Y. Jacques, and A. Plet. 2008. The exon-3-encoded domain of IL-15 α contributes to IL-15 high-affinity binding and is crucial for the IL-15 antagonistic effect of soluble IL-15 α . *J. Mol. Biol.* 382:1–12. doi:10.1016/j.jmb.2008.07.019.

Bowles, J.A., S.-Y. Wang, B.K. Link, B. Allan, G. Beuerlein, M.-A. Campbell, D. Marquis, B. Ondek, J.E. Wooldridge, B.J. Smith, J.B. Breitmeyer, and G.J. Weiner. 2006. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood.* 108:2648–54. doi:10.1182/blood-2006-04-020057.

Brand, T.M., M. Iida, and D.L. Wheeler. 2011. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol. Ther.* 11:777–92.

Brandt, C.S., M. Baratin, E.C. Yi, J. Kennedy, Z. Gao, B. Fox, B. Haldeman, C.D. Ostrander, T. Kaifu, C. Chabannon, A. Moretta, R. West, W. Xu, E. Vivier, and S.D. Levin. 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.* 206:1495–503. doi:10.1084/jem.20090681.

Braud, V.M., D.S. Allan, C.A. O’Callaghan, K. Söderström, A. D’Andrea, G.S. Ogg, S. Lazetic, N.T. Young, J.I. Bell, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and A.J. McMichael. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* 391:795–9. doi:10.1038/35869.

Breunis, W.B., E. van Mirre, J. Geissler, N. Laddach, G. Wolbink, E. van der Schoot, M. de Haas, M. de Boer, D. Roos, and T.W. Kuijpers. 2009. Copy number variation at the FCGR locus includes FCGR3A, FCGR2C and FCGR3B but not FCGR2A and FCGR2B. *Hum. Mutat.* 30:E640–50. doi:10.1002/humu.20997.

Bruhns, P. 2012. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 119:5640–9. doi:10.1182/blood-2012-01-380121.

Bruhns, P., B. Iannascoli, P. England, D.A. Mancardi, N. Fernandez, S. Jorieux, and M. Daëron. 2009. Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 113:3716–25. doi:10.1182/blood-2008-09-179754.

Bryceson, Y.T., H.-G. Ljunggren, and E.O. Long. 2009. Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood*. 114:2657–66. doi:10.1182/blood-2009-01-201632.

Bryceson, Y.T., M.E. March, D.F. Barber, H.-G. Ljunggren, and E.O. Long. 2005. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J. Exp. Med.* 202:1001–12. doi:10.1084/jem.20051143.

Bryceson, Y.T., M.E. March, H.-G. Ljunggren, and E.O. Long. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*. 107:159–66. doi:10.1182/blood-2005-04-1351.

Burkett, P.R., R. Koka, M. Chien, S. Chai, D.L. Boone, and A. Ma. 2004. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8 $^{+}$ T cell homeostasis. *J. Exp. Med.* 200:825–34. doi:10.1084/jem.20041389.

Byrd, J.C., S. Kitada, I.W. Flinn, J.L. Aron, M. Pearson, D. Lucas, and J.C. Reed. 2002. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*. 99:1038–43.

Caescu, C.I., G.R. Jeschke, and B.E. Turk. 2009. Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem. J.* 424:79–88. doi:10.1042/BJ20090549.

Calemma, R., A. Ottaiano, A.M. Trotta, G. Nasti, C. Romano, M. Napolitano, D. Galati, P. Borrelli, S. Zanotta, A. Cassata, G. Castello, V.R. Iaffaioli, and S. Scala. 2012. Fc gamma receptor IIIa polymorphisms in advanced colorectal cancer patients correlated with response to anti-EGFR antibodies and clinical outcome. *J. Transl. Med.* 10:232. doi:10.1186/1479-5876-10-232.

Caligiuri, M.A., A. Zmuidzinas, T.J. Manley, H. Levine, K.A. Smith, and J. Ritz. 1990. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J. Exp. Med.* 171:1509–26.

Campbell, K.S., and A.K. Purdy. 2011. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*. 132:315–25. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03398.x.

Cantoni, C., C. Bottino, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, R. Castriconi, M. Vitale, D. Pende, S. Sivori, R. Millo, R. Biassoni, L. Moretta, and A. Moretta. 1999. Molecular and functional characterization of IRp60, a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 29:3148–59. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3148::AID-IMMU3148>3.0.CO;2-L.

Carpen, O., I. Virtanen, and E. Saksela. 1982. Ultrastructure of human natural killer cells: nature of the cytolytic contacts in relation to cellular secretion. *J. Immunol.* 128:2691–7.

Carson, W.E., T.A. Fehniger, S. Haldar, K. Eckhert, M.J. Lindemann, C.F. Lai, C.M. Croce, H. Baumann, and M.A. Caligiuri. 1997. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J. Clin. Invest.* 99:937–43. doi:10.1172/JCI119258.

Cartron, G. 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood.* 99:754–758. doi:10.1182/blood.V99.3.754.

Cecchetti, S., F. Spadaro, L. Lugini, F. Podo, and C. Ramoni. 2007. Functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in regulating CD16 membrane expression in natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 37:2912–22. doi:10.1002/eji.200737266.

Chan, A., D.-L. Hong, A. Atzberger, S. Kollnberger, A.D. Filer, C.D. Buckley, A. McMichael, T. Enver, and P. Bowness. 2007. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J. Immunol.* 179:89–94.

Chan, C.W., E. Crafton, H.-N. Fan, J. Flook, K. Yoshimura, M. Skarica, D. Brockstedt, T.W. Dubensky, M.F. Stins, L.L. Lanier, D.M. Pardoll, and F. Housseau. 2006. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat. Med.* 12:207–13. doi:10.1038/nm1352.

Chávez-Galán, L., M.C. Arenas-Del Angel, E. Zenteno, R. Chávez, and R. Lascurain. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* 6:15–25. doi:10.1038/cmi.2009.3.

Chen, Z., and M.S. Freedman. 2008. CD16+ γδ T cells mediate antibody dependent cellular cytotoxicity: potential mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* 128:219–27. doi:10.1016/j.clim.2008.03.513.

Cho, H.-S., K. Mason, K.X. Ramyar, A.M. Stanley, S.B. Gabelli, D.W. Denney, and D.J. Leahy. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature.* 421:756–60. doi:10.1038/nature01392.

Chung, C.H., B. Mirakhur, E. Chan, Q.-T. Le, J. Berlin, M. Morse, B.A. Murphy, S.M. Satinover, J. Hosen, D. Mauro, R.J. Slebos, Q. Zhou, D. Gold, T. Hatley, D.J. Hicklin, and T.A.E. Platts-Mills. 2008. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-α-1,3-galactose. *N. Engl. J. Med.* 358:1109–17. doi:10.1056/NEJMoa074943.

Claus, M., S. Meinke, R. Bhat, and C. Watzl. 2008. Regulation of NK cell activity by 2B4, NTB-A and CRACC. *Front. Biosci.* 13:956–65.

Clémenceau, B., R. Vivien, M. Berthomé, N. Robillard, R. Garand, G. Gallot, S. Volland, and H. Vié. 2008. Effector memory αβ T lymphocytes can express FcγRIIIa and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Immunol.* 180:5327–34.

Clynes, R.A., T.L. Towers, L.G. Presta, and J. V Ravetch. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6:443–6. doi:10.1038/74704.

Coller, B.S., and L.E. Scudder. 1985. Inhibition of dog platelet function by in vivo infusion of F(ab')₂ fragments of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood*. 66:1456–9.

Colonna, M., E.G. Brooks, M. Falco, G.B. Ferrara, and J.L. Strominger. 1993. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science*. 260:1121–4.

Colonna, M., H. Nakajima, F. Navarro, and M. López-Botet. 1999. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 66:375–81.

Condon, T.P., S. Flournoy, G.J. Sawyer, B.F. Baker, T.K. Kishimoto, and C.F. Bennett. 2001. ADAM17 but not ADAM10 mediates tumor necrosis factor-alpha and L-selectin shedding from leukocyte membranes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 11:107–16. doi:10.1089/108729001750171353.

Congy-Jolivet, N., A. Bolzec, D. Ternant, M. Ohresser, H. Watier, and G. Thibault. 2008. Fc gamma RIIIA expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma RIIIA-158V allotype. *Cancer Res.* 68:976–80. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6523.

Congy-Jolivet, N., A. Probst, H. Watier, and G. Thibault. 2007. Recombinant therapeutic monoclonal antibodies: mechanisms of action in relation to structural and functional duality. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 64:226–33. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.06.013.

Cooley, S., L.J. Burns, T. Repka, and J.S. Miller. 1999. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp. Hematol.* 27:1533–41.

Cooper, M. a. 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood*. 97:3146–3151. doi:10.1182/blood.V97.10.3146.

Cooper, M.A., J.E. Bush, T.A. Fehniger, J.B. VanDeusen, R.E. Waite, Y. Liu, H.L. Aguila, and M.A. Caligiuri. 2002. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood*. 100:3633–8. doi:10.1182/blood-2001-12-0293.

Cooper, M.A., J.M. Elliott, P.A. Keyel, L. Yang, J.A. Carrero, and W.M. Yokoyama. 2009. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:1915–9. doi:10.1073/pnas.0813192106.

Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri. 2001a. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22:633–40.

Cooper, M.A., T.A. Fehniger, S.C. Turner, K.S. Chen, B.A. Ghaheri, T. Ghayur, W.E. Carson, and M.A. Caligiuri. 2001b. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*. 97:3146–51.

Cosman, D., N. Fanger, L. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson, and M.L. Hsu. 1997. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*. 7:273–82.

Cragg, M.S., and M.J. Glennie. 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood*. 103:2738–43. doi:10.1182/blood-2003-06-2031.

Daëron, M., S. Latour, O. Malbec, E. Espinosa, P. Pina, S. Pasmans, and W.H. Fridman. 1995. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity*. 3:635–46.

Dall'Ozzo, S., S. Tartas, G. Paintaud, G. Cartron, P. Colombat, P. Bardos, H. Watier, and G. Thibault. 2004. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res*. 64:4664–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2862.

Davies, A.J. 2007. Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma: Y90 ibritumomab tiuxetan and I(131) tositumomab. *Oncogene*. 26:3614–28. doi:10.1038/sj.onc.1210378.

Dornan, D., O. Spleiss, R.-F. Yeh, G. Duchateau-Nguyen, A. Dufour, J. Zhi, T. Robak, S.I. Moiseev, A. Dmoszynska, P. Solal-Celigny, K. Warzocha, J. Loscertales, J. Catalano, B. V Afanasiev, L. Larratt, V.A. Rossiev, I. Bence-Bruckler, C.H. Geisler, M. Montillo, M.K. Wenger, and M. Weissner. 2010. Effect of FCGR2A and FCGR3A variants on CLL outcome. *Blood*. 116:4212–22. doi:10.1182/blood-2010-03-272765.

Dubois, S., J. Mariner, T.A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2002. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity*. 17:537–47.

Dutertre, C.-A., E. Bonnin-Gélizé, K. Pulford, D. Bourel, W.-H. Fridman, and J.-L. Teillaud. 2008. A novel subset of NK cells expressing high levels of inhibitory FcgammaRIIB modulating antibody-dependent function. *J. Leukoc. Biol.* 84:1511–20. doi:10.1189/jlb.0608343.

Eagle, R.A., and J. Trowsdale. 2007. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat. Rev. Immunol.* 7:737–44. doi:10.1038/nri2144.

Edwards, D.R., M.M. Handsley, and C.J. Pennington. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29:258–89. doi:10.1016/j.mam.2008.08.001.

Esin, S., G. Batoni, C. Counoupas, A. Stringaro, F.L. Brancatisano, M. Colone, G. Maisetta, W. Florio, G. Arancia, and M. Campa. 2008. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect. Immun.* 76:1719–27. doi:10.1128/IAI.00870-07.

Esin, S., C. Counoupas, A. Aulicino, F.L. Brancatisano, G. Maisetta, D. Bottai, M. Di Luca, W. Florio, M. Campa, and G. Batoni. 2013. Interaction of Mycobacterium tuberculosis cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2. *Scand. J. Immunol.* 77:460–9. doi:10.1111/sji.12052.

Fauriat, C., S. Andersson, A.T. Björklund, M. Carlsten, M. Schaffer, N.K. Björkström, B.C. Baumann, J. Michaëlsson, H.-G. Ljunggren, and K.-J. Malmberg. 2008. Estimation of the size of the alloreactive NK cell repertoire: studies in individuals homozygous for the group A KIR haplotype. *J. Immunol.* 181:6010–9.

Fauriat, C., M.A. Ivarsson, H.-G. Ljunggren, K.-J. Malmberg, and J. Michaëlsson. 2010a. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood*. 115:1166–74. doi:10.1182/blood-2009-09-245746.

Fauriat, C., E.O. Long, H.-G. Ljunggren, and Y.T. Bryceson. 2010b. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 115:2167–76. doi:10.1182/blood-2009-08-238469.

Fehniger, T.A., and M.A. Caligiuri. 2001. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*. 97:14–32.

Ferlazzo, G., D. Thomas, S.-L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W.A. Muller, A. Moretta, and C. Münz. 2004. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol.* 172:1455–62.

Firan, M., R. Bawdon, C. Radu, R.J. Ober, D. Eaken, F. Antohe, V. Ghetie, and E.S. Ward. 2001. The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of gamma-globulin in humans. *Int. Immunol.* 13:993–1002.

Foley, B., S. Cooley, M.R. Verneris, J. Curtsinger, X. Luo, E.K. Waller, D.J. Weisdorf, and J.S. Miller. 2011. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood*. 118:2784–92. doi:10.1182/blood-2011-04-347070.

Freud, A.G., B. Becknell, S. Roychowdhury, H.C. Mao, A.K. Ferketich, G.J. Nuovo, T.L. Hughes, T.B. Marburger, J. Sung, R.A. Baiocchi, M. Guimond, and M.A. Caligiuri. 2005. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity*. 22:295–304. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.013.

Freud, A.G., and M.A. Caligiuri. 2006. Human natural killer cell development. *Immunol. Rev.* 214:56–72. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x.

Frey, M., N.B. Packianathan, T.A. Fehniger, M.E. Ross, W.C. Wang, C.C. Stewart, M.A. Caligiuri, and S.S. Evans. 1998. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J. Immunol.* 161:400–8.

Di Gaetano, N., E. Cittera, R. Nota, A. Vecchi, V. Grieco, E. Scanziani, M. Botto, M. Introna, and J. Golay. 2003. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J. Immunol.* 171:1581–7.

Gallatin, W.M., I.L. Weissman, and E.C. Butcher. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*. 304:30–4.

Galon, J., I. Moldovan, a Galinha, M. a Provost-Marloie, H. Kaudewitz, S. Roman-Roman, W.H. Fridman, and C. Sautès. 1998. Identification of the cleavage site involved in production of plasma soluble Fc gamma receptor type III (CD16). *Eur. J. Immunol.* 28:2101–7. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199807)28:07<2101::AID-IMMU2101>3.0.CO;2-W.

Gardiner, C.M. 2008. Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. *Int. J. Immunogenet.* 35:1–8. doi:10.1111/j.1744-313X.2007.00739.x.

Gelderman, K.A., S. Tomlinson, G.D. Ross, and A. Gorter. 2004. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* 25:158–64. doi:10.1016/j.it.2004.01.008.

Gessner, J.E., H. Heiken, A. Tamm, and R.E. Schmidt. 1998. The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol.* 76:231–48.

Ghesquières, H., G. Cartron, J.F. Seymour, M.-H. Delfau-Larue, F. Offner, P. Soubeyran, A. Perrot, P. Brice, R. Bouabdallah, A. Sonet, J. Dupuis, O. Casasnovas, J.V. Catalano, A. Delmer, F. Jardin, A. Verney, P. Dartigues, and G. Salles. 2012. Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemoimmunotherapy in the PRIMA study is not affected by FCGR3A and FCGR2A polymorphisms. *Blood.* 120:2650–7. doi:10.1182/blood-2012-05-431825.

Gleason, M.K., M.R. Verneris, D.A. Todhunter, B. Zhang, V. McCullar, S.X. Zhou, A. Panoskaltsis-Mortari, L.M. Weiner, D.A. Vallera, and J.S. Miller. 2012. Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production. *Mol. Cancer Ther.* 11:2674–84. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0692.

Glennie, M.J., R.R. French, M.S. Cragg, and R.P. Taylor. 2007. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* 44:3823–37. doi:10.1016/j.molimm.2007.06.151.

Goldstein, N.I., M. Prewett, K. Zuklys, P. Rockwell, and J. Mendelsohn. 1995. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin. Cancer Res.* 1:1311–8.

Gonzales, P.E., A. Solomon, A.B. Miller, M.A. Leesnitzer, I. Sagi, and M.E. Milla. 2004. Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J. Biol. Chem.* 279:31638–45. doi:10.1074/jbc.M401311200.

Greenwood, J., M. Clark, and H. Waldmann. 1993. Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions. *Eur. J. Immunol.* 23:1098–104. doi:10.1002/eji.1830230518.

Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, and T. Spies. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:12445–50.

Gross, C.C., J.A. Brzustowski, D. Liu, and E.O. Long. 2010. Tethering of intercellular adhesion molecule on target cells is required for LFA-1-dependent NK cell adhesion and granule polarization. *J. Immunol.* 185:2918–26. doi:10.4049/jimmunol.1000761.

Grzywacz, B., N. Kataria, and M.R. Verneris. 2007. CD56(dim)CD16(+) NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K.* 21:356–9; author reply 359. doi:10.1038/sj.leu.2404499.

Gumperz, J.E., L.D. Barber, N.M. Valiante, L. Percival, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and P. Parham. 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.* 158:5237–41.

Guo, S., M. Peng, Q. Zhao, and W. Zhang. 2012. Role of ADAM10 and ADAM17 in CD16b shedding mediated by different stimulators. *Chin. Med. Sci. J.* 27:73–9.

De Haas, M., M. Kleijer, R.M. Minchinton, D. Roos, and A.E. von dem Borne. 1994. Soluble Fc gamma RIIIa is present in plasma and is derived from natural killer cells. *J. Immunol.* 152:900–7.

De Haas, M., H.R. Koene, M. Kleijer, E. de Vries, S. Simsek, M.J. van Tol, D. Roos, and A.E. von dem Borne. 1996. A triallelic Fc gamma receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc gamma RIIIa. *J. Immunol.* 156:2948–55.

Halfteck, G.G., M. Elboim, C. Gur, H. Achdout, H. Ghadially, and O. Mandelboim. 2009. Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J. Immunol.* 182:2221–30. doi:10.4049/jimmunol.0801878.

Hamann, I., N. Unterwalder, A.E. Cardona, C. Meisel, F. Zipp, R.M. Ransohoff, and C. Infante-Duarte. 2011. Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells. *Immunology.* 133:62–73. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03409.x.

Harrison, D., J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 1991. Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J. Immunol.* 147:3459–65.

Van der Heijden, J., W.B. Breunis, J. Geissler, M. de Boer, T.K. van den Berg, and T.W. Kuijpers. 2012. Phenotypic variation in IgG receptors by nonclassical FCGR2C alleles. *J. Immunol.* 188:1318–24. doi:10.4049/jimmunol.1003945.

Herberman, R.B., M.E. Nunn, H.T. Holden, and D.H. Lavrin. 1975a. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer.* 16:230–9.

Herberman, R.B., M.E. Nunn, and D.H. Lavrin. 1975b. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer.* 16:216–29.

Van den Herik-Oudijk, I.E., M.W. Ter Bekke, M.J. Tempelman, P.J. Capel, and J.G. Van de Winkel. 1995a. Functional differences between two Fc receptor ITAM signaling motifs. *Blood.* 86:3302–7.

Van den Herik-Oudijk, I.E., P.J. Capel, T. van der Bruggen, and J.G. Van de Winkel. 1995b. Identification of signaling motifs within human Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIb isoforms. *Blood.* 85:2202–11.

Hershkovitz, O., B. Rosental, L.A. Rosenberg, M.E. Navarro-Sanchez, S. Jivov, A. Zilka, O. Gershoni-Yahalom, E. Brient-Litzler, H. Bedouelle, J.W. Ho, K.S. Campbell, B. Rager-Zisman, P. Despres, and A. Porgador. 2009. NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J. Immunol.* 183:2610–21. doi:10.4049/jimmunol.0802806.

Ho, J.W., O. Hershkovitz, M. Peiris, A. Zilka, A. Bar-Ilan, B. Nal, K. Chu, M. Kudelko, Y.W. Kam, H. Achdout, M. Mandelboim, R. Altmeyer, O. Mandelboim, R. Bruzzone, and A. Porgador. 2008. H5-type influenza virus hemagglutinin is functionally recognized by the natural killer-activating receptor NKp44. *J. Virol.* 82:2028–32. doi:10.1128/JVI.02065-07.

Hosomi, S., Z. Chen, K. Baker, L. Chen, Y.-H. Huang, T. Olszak, S. Zeissig, J.H. Wang, O. Mandelboim, N. Beauchemin, L.L. Lanier, and R.S. Blumberg. 2013. CEACAM1 on activated NK cells inhibits NKG2D-mediated cytolytic function and signaling. *Eur. J. Immunol.* 43:2473–83. doi:10.1002/eji.201242676.

Huizinga, T.W., M. de Haas, M. Kleijer, J.H. Nuijens, D. Roos, and A.E. von dem Borne. 1990. Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J. Clin. Invest.* 86:416–23. doi:10.1172/JCI114727.

Huizinga, T.W., C.E. van der Schoot, C. Jost, R. Klaassen, M. Kleijer, A.E. von dem Borne, D. Roos, and P.A. Tetteroo. 1988. The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature.* 333:667–9. doi:10.1038/333667a0.

Hunt, J.S., M.G. Petroff, R.H. McIntire, and C. Ober. 2005. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J.* 19:681–93. doi:10.1096/fj.04-2078rev.

Huntington, N.D., N. Legrand, N.L. Alves, B. Jaron, K. Weijer, A. Plet, E. Corcuff, E. Mortier, Y. Jacques, H. Spits, and J.P. Di Santo. 2009. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 206:25–34. doi:10.1084/jem.20082013.

Huovila, A.-P.J., A.J. Turner, M. Peltö-Huikko, I. Kärkkäinen, and R.M. Ortiz. 2005. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.* 30:413–22. doi:10.1016/j.tibs.2005.05.006.

Hurvitz, S.A., D.J. Betting, H.M. Stern, E. Quinaux, J. Stinson, S. Seshagiri, Y. Zhao, M. Buyse, J. Mackey, A. Driga, S. Damaraju, M.X. Sliwkowski, N.J. Robert, V. Valero, J. Crown, C. Falkson, A. Brufsky, T. Pienkowski, W. Eiermann, M. Martin, V. Bee, O. Marathe, D.J. Slamon, and J.M. Timmerman. 2012. Analysis of Fcγ receptor IIIa and IIa polymorphisms: lack of correlation with outcome in trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 18:3478–86. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2294.

Iida, M., T.M. Brand, M.M. Starr, C. Li, E.J. Huppert, N. Luthar, M.W. Pedersen, I.D. Horak, M. Kragh, and D.L. Wheeler. 2013. Sym004, a novel EGFR antibody mixture, can overcome acquired resistance to cetuximab. *Neoplasia.* 15:1196–206.

Indik, Z.K., J.G. Park, S. Hunter, and A.D. Schreiber. 1995. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood.* 86:4389–99.

Ito, M., T. Maruyama, N. Saito, S. Koganei, K. Yamamoto, and N. Matsumoto. 2006. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 203:289–95. doi:10.1084/jem.20051986.

Jefferis, R., and J. Lund. 2002. Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. *Immunol. Lett.* 82:57–65.

Joncker, N.T., N.C. Fernandez, E. Treiner, E. Vivier, and D.H. Raulet. 2009. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J. Immunol.* 182:4572–80. doi:10.4049/jimmunol.0803900.

Juelke, K., M. Killig, M. Luetke-Eversloh, E. Parente, J. Gruen, B. Morandi, G. Ferlazzo, A. Thiel, I. Schmitt-Knosalla, and C. Romagnani. 2010. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood.* 116:1299–307. doi:10.1182/blood-2009-11-253286.

Juelke, K., M. Killig, A. Thiel, J. Dong, and C. Romagnani. 2009. Education of hyporesponsive NK cells by cytokines. *Eur. J. Immunol.* 39:2548–55. doi:10.1002/eji.200939307.

Jutila, M.A., E.L. Berg, T.K. Kishimoto, L.J. Picker, R.F. Bargatze, D.K. Bishop, C.G. Orosz, N.W. Wu, and E.C. Butcher. 1989. Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils, and monocytes. Role of homing receptors and other adhesion molecules. *Transplantation.* 48:727–31.

Kabat, J., F. Borrego, A. Brooks, and J.E. Coligan. 2002. Role that each NKG2A immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif plays in mediating the human CD94/NKG2A inhibitory signal. *J. Immunol.* 169:1948–58.

Kahn, J., R.H. Ingraham, F. Shirley, G.I. Migaki, and T.K. Kishimoto. 1994. Membrane proximal cleavage of L-selectin: identification of the cleavage site and a 6-kD transmembrane peptide fragment of L-selectin. *J. Cell Biol.* 125:461–70.

Kaiser, B.K., J.C. Pizarro, J. Kerns, and R.K. Strong. 2008. Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:6696–701. doi:10.1073/pnas.0802736105.

Kärre, K., H.G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 319:675–8. doi:10.1038/319675a0.

Kennedy, M.K., M. Glaccum, S.N. Brown, E.A. Butz, J.L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C.R. Willis, K. Brasel, P.J. Morrissey, K. Stocking, J.C. Schuh, S. Joyce, and J.J. Peschon. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191:771–80.

Khayat, D., C. Soubrane, J.M. Andrieu, S. Visonneau, D. Eme, J.M. Tourani, K. Beldjord, M. Weil, E. Fernandez, and C. Jacquillat. 1990. Changes of soluble CD16 levels in serum of HIV-infected patients: correlation with clinical and biologic prognostic factors. *J. Infect. Dis.* 161:430–5.

Kiessling, R., E. Klein, H. Pross, and H. Wigzell. 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.* 5:117–21. doi:10.1002/eji.1830050209.

Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell. 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.* 5:112–7. doi:10.1002/eji.1830050208.

Kim, J.-S., S.-E. Choi, I.-H. Yun, J.-Y. Kim, C. Ahn, S.-J. Kim, J. Ha, E.-S. Hwang, C.-Y. Cha, S. Miyagawa, and C.-G. Park. 2004. Human cytomegalovirus UL18 alleviated human NK-mediated swine endothelial cell lysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315:144–50. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.027.

Kim, S., J. Poursine-Laurent, S.M. Truscott, L. Lybarger, Y.-J. Song, L. Yang, A.R. French, J.B. Sunwoo, S. Lemieux, T.H. Hansen, and W.M. Yokoyama. 2005. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* 436:709–13. doi:10.1038/nature03847.

Kim, S., J.B. Sunwoo, L. Yang, T. Choi, Y.-J. Song, A.R. French, A. Vlahiotis, J.F. Piccirillo, M. Cella, M. Colonna, T. Mohanakumar, K.C. Hsu, B. Dupont, and W.M. Yokoyama. 2008. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:3053–3058. doi:10.1073/pnas.0712229105.

Kimball, J.A., D.J. Norman, C.F. Shield, T.J. Schroeder, P. Lisi, M. Garovoy, J.B. O'Connell, F. Stuart, S. V McDiarmid, and W. Wall. 1995. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. *Transpl. Immunol.* 3:212–21.

Kobayashi, H., S. Dubois, N. Sato, H. Sabzevari, Y. Sakai, T.A. Waldmann, and Y. Tagaya. 2005. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood.* 105:721–7. doi:10.1182/blood-2003-12-4187.

Koene, H.R., M. de Haas, M. Kleijer, D. Roos, and A.E. von dem Borne. 1996. NA-phenotype-dependent differences in neutrophil Fc gamma RIIIb expression cause differences in plasma levels of soluble Fc gamma RIII. *Br. J. Haematol.* 93:235–41.

Koene, H.R., M. Kleijer, J. Algra, D. Roos, A.E. von dem Borne, and M. de Haas. 1997. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 90:1109–14.

Koene, H.R., M. Kleijer, A.J. Swaak, K.E. Sullivan, M. Bijl, M.A. Petri, C.G. Kallenberg, D. Roos, A.E. von dem Borne, and M. de Haas. 1998. The Fc gammaRIIIA-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 41:1813–8. doi:10.1002/1529-0131(199810)41:10<1813::AID-ART13>3.0.CO;2-6.

Köhler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:495–7.

Korbel, D.S., K.C. Newman, C.R. Almeida, D.M. Davis, and E.M. Riley. 2005. Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.* 175:7466–73.

Krop, I., and E.P. Winer. 2014. Trastuzumab emtansine: a novel antibody-drug conjugate for HER2-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 20:15–20. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0541.

Krzewski, K., A. Gil-Krzewska, V. Nguyen, G. Peruzzi, and J.E. Coligan. 2013. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood.* 121:4672–83. doi:10.1182/blood-2012-08-453738.

Kumar, V., and M.E. McNerney. 2005. A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 5:363–74. doi:10.1038/nri1603.

Kupfer, A., G. Dennert, and S.J. Singer. 1983. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:7224–8.

Kusumi, M., T. Yamashita, T. Fujii, T. Nagamatsu, S. Kozuma, and Y. Taketani. 2006. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J. Reprod. Immunol.* 70:33–42. doi:10.1016/j.jri.2005.12.008.

Lafont, V., J. Liautard, J.P. Liautard, and J. Favero. 2001. Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J. Immunol.* 166:7190–9.

Lajoie, L., N. Congy-Jolivet, A. Bolzec, V. Gouilleux-Gruart, E. Sicard, H.C. Sung, F. Peiretti, T. Moreau, H. Vié, B. Clémenceau, and G. Thibault. 2014. ADAM17-Mediated Shedding of FcγRIIIA on Human NK Cells: Identification of the Cleavage Site and Relationship with Activation. *J. Immunol.* doi:10.4049/jimmunol.1301024.

Lanier, L.L. 2005. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23:225–74. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526.

Lanier, L.L., J.H. Phillips, J. Hackett, M. Tutt, and V. Kumar. 1986. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.* 137:2735–9.

Lanier, L.L., G. Yu, and J.H. Phillips. 1989. Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature.* 342:803–5. doi:10.1038/342803a0.

Lazar, G.A., W. Dang, S. Karki, O. Vafa, J.S. Peng, L. Hyun, C. Chan, H.S. Chung, A. Eivazi, S.C. Yoder, J. Vielmetter, D.F. Carmichael, R.J. Hayes, and B.I. Dahiyat. 2006. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:4005–10. doi:10.1073/pnas.0508123103.

Lazetic, S., C. Chang, J.P. Houchins, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1996. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J. Immunol.* 157:4741–5.

Li, X., J.G. Baskin, E.K. Mangan, K. Su, A.W. Gibson, C. Ji, J.C. Edberg, and R.P. Kimberly. 2012. The unique cytoplasmic domain of human FcγRIIIA regulates receptor-mediated function. *J. Immunol.* 189:4284–94. doi:10.4049/jimmunol.1200704.

Louis, E., Z. El Ghoul, S. Vermeire, S. Dall'Ozzo, P. Rutgeerts, G. Paintaud, J. Belaiche, M. De Vos, A. Van Gossum, J.-F. Colombel, and H. Watier. 2004. Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19:511–9.

MacFarlane, A.W., and K.S. Campbell. 2006. Signal transduction in natural killer cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 298:23–57.

Mainiero, F., A. Gismondi, A. Soriani, M. Cippitelli, G. Palmieri, J. Jacobelli, M. Piccoli, L. Frati, and A. Santoni. 1998. Integrin-mediated ras-extracellular regulated kinase (ERK) signaling regulates interferon gamma production in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 188:1267–75.

Mancardi, D.A., B. Iannascoli, S. Hoos, P. England, M. Daëron, and P. Bruhns. 2008. FcγRIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcεRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J. Clin. Invest.* 118:3738–50. doi:10.1172/JCI36452.

Manches, O., G. Lui, L. Chaperot, R. Gressin, J.-P. Molens, M.-C. Jacob, J.-J. Sotto, D. Leroux, J.-C. Bensa, and J. Plumas. 2003. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood.* 101:949–54. doi:10.1182/blood-2002-02-0469.

Mandelboim, O., N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T.I. Arnon, Y. Bushkin, D.M. Davis, J.L. Strominger, J.W. Yewdell, and A. Porgador. 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells. *Nature.* 409:1055–60. doi:10.1038/35059110.

Markel, G., D. Wolf, J. Hanna, R. Gazit, D. Goldman-Wohl, Y. Lavy, S. Yagel, and O. Mandelboim. 2002. Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *J. Clin. Invest.* 110:943–53. doi:10.1172/JCI15643.

Masuda, M., T. Morimoto, M. De Haas, N. Nishimura, K. Nakamoto, K. Okuda, Y. Komiyama, R. Ogawa, and H. Takahashi. 2003. Increase of soluble FcγRIIIa derived from natural killer cells and macrophages in plasma from patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 30:1911–7.

Mathiot, C., J.Y. Mary, E. Tartour, T. Facon, M. Monconduit, B. Grosbois, J.P. Pollet, J.L. Michaux, L. Euller Ziegler, C. Sautès, R. Bataille, and W.H. Fridman. 1996. Soluble CD16 (sCD16), a marker of malignancy in individuals with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Br. J. Haematol.* 95:660–5.

McNerney, M.E., and V. Kumar. 2006. The CD2 family of natural killer cell receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 298:91–120.

Mechetina, L. V, A.M. Najakshin, B.Y. Alabyev, N.A. Chikaev, and A. V Taranin. 2002. Identification of CD16-2, a novel mouse receptor homologous to CD16/Fc gamma RIII. *Immunogenetics.* 54:463–8. doi:10.1007/s00251-002-0486-0.

Meknache, N., F. Jönsson, J. Laurent, M.-T. Guinépain, and M. Daëron. 2009. Human basophils express the glycosylphosphatidylinositol-anchored low-affinity IgG receptor FcgammaRIIB (CD16B). *J. Immunol.* 182:2542–50. doi:10.4049/jimmunol.0801665.

Mellor, J.D., M.P. Brown, H.R. Irving, J.R. Zalcberg, and A. Dobrovic. 2013. A critical review of the role of Fc gamma receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *J. Hematol. Oncol.* 6:1. doi:10.1186/1756-8722-6-1.

Metes, D., C. Galatiuc, I. Moldovan, P.A. Morel, W.H. Chambers, A.B. DeLeo, H. Rabinowich, R. Schall, T.L. Whiteside, and A. Sulica. Expression and function of Fc gamma RII on human natural killer cells. *Nat. Immun.* 13:289–300.

Metes, D., M. Manciulea, D. Pretrusca, H. Rabinowich, L.K. Ernst, I. Popescu, A. Calugaru, A. Sulica, W.H. Chambers, R.B. Herberman, and P.A. Morel. 1999. Ligand binding specificities and signal transduction pathways of Fc gamma receptor IIc isoforms: the CD32 isoforms expressed by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 29:2842–52. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2842::AID-IMMU2842>3.0.CO;2-5.

Michaëlsson, J., C. Teixeira de Matos, A. Achour, L.L. Lanier, K. Kärre, and K. Söderström. 2002. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J. Exp. Med.* 196:1403–14.

Middelhoven, P.J., A. Ager, D. Roos, and A.J. Verhoeven. 1997. Involvement of a metalloprotease in the shedding of human neutrophil Fc gammaRIIB. *FEBS Lett.* 414:14–8.

Milla, M.E., P.E. Gonzales, and J.D. Leonard. 2006. The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch. *Cell Biochem. Biophys.* 44:342–8. doi:10.1385/CBB:44:3:342.

Milla, M.E., M.A. Leesnitzer, M.L. Moss, W.C. Clay, H.L. Carter, A.B. Miller, J.L. Su, M.H. Lambert, D.H. Willard, D.M. Sheeley, T.A. Kost, W. Burkhart, M. Moyer, R.K. Blackburn, G.L. Pahel, J.L. Mitchell, C.R. Hoffman, and J.D. Becherer. 1999. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *J. Biol. Chem.* 274:30563–70.

Miller, J.D., D.A. Weber, C. Ibegbu, J. Pohl, J.D. Altman, and P.E. Jensen. 2003. Analysis of HLA-E peptide-binding specificity and contact residues in bound peptide required for recognition by CD94/NKG2. *J. Immunol.* 171:1369–75.

Moga, E., E. Alvarez, E. Cantó, S. Vidal, J.L. Rodríguez-Sánchez, J. Sierra, and J. Briones. 2008. NK cells stimulated with IL-15 or CpG ODN enhance rituximab-dependent cellular cytotoxicity against B-cell lymphoma. *Exp. Hematol.* 36:69–77. doi:10.1016/j.exphem.2007.08.012.

Moga, E., E. Cantó, S. Vidal, C. Juarez, J. Sierra, and J. Briones. 2011. Interleukin-15 enhances rituximab-dependent cytotoxicity against chronic lymphocytic leukemia cells and overcomes transforming growth factor beta-mediated immunosuppression. *Exp. Hematol.* 39:1064–71. doi:10.1016/j.exphem.2011.08.006.

Moretta, A. 2005. The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 17:306–11. doi:10.1016/j.coi.2005.03.004.

Moretta, L., C. Bottino, C. Cantoni, M.C. Mingari, and A. Moretta. 2001. Human natural killer cell function and receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1:387–91.

Moroi, R., K. Endo, Y. Kinouchi, H. Shiga, Y. Kakuta, M. Kuroha, Y. Kanazawa, Y. Shimodaira, T. Horiuchi, S. Takahashi, and T. Shimosegawa. 2013. FCGR3A-158 polymorphism influences the biological response to infliximab in Crohn's disease through affecting the ADCC activity. *Immunogenetics.* 65:265–71. doi:10.1007/s00251-013-0679-8.

Mortier, E., R. Advincula, L. Kim, S. Chmura, J. Barrera, B. Reizis, B.A. Malynn, and A. Ma. 2009. Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of distinct CD8⁺ T cell subsets. *Immunity.* 31:811–22. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.017.

Mortier, E., J. Bernard, A. Plet, and Y. Jacques. 2004. Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J. Immunol.* 173:1681–8.

Mortier, E., A. Quémener, P. Vusio, I. Lorenzen, Y. Boublik, J. Grötzinger, A. Plet, and Y. Jacques. 2006. Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 281:1612–9. doi:10.1074/jbc.M508624200.

Moss, M.L., M. Bomar, Q. Liu, H. Sage, P. Dempsey, P.M. Lenhart, P.A. Gillispie, A. Stoeck, D. Wildeboer, J.W. Bartsch, R. Palmisano, and P. Zhou. 2007. The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J. Biol. Chem.* 282:35712–21. doi:10.1074/jbc.M703231200.

Moss, M.L., A. Stoeck, W. Yan, and P.J. Dempsey. 2008. ADAM10 as a target for anti-cancer therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:2–8.

Mössner, E., P. Brünker, S. Moser, U. Püntener, C. Schmidt, S. Herter, R. Grau, C. Gerdes, A. Nopora, E. van Puijenbroek, C. Ferrara, P. Sondermann, C. Jäger, P. Strein, G. Fertig, T. Friess, C. Schüll, S. Bauer, J. Dal Porto, C. Del Nagro, K. Dabbagh, M.J.S. Dyer, S. Poppema, C. Klein, and P. Umaña. 2010. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood.* 115:4393–402. doi:10.1182/blood-2009-06-225979.

Muller, Y.A., Y. Chen, H.W. Christinger, B. Li, B.C. Cunningham, H.B. Lowman, and A.M. de Vos. 1998. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure.* 6:1153–67.

Munger, W., S.Q. DeJoy, R. Jeyaseelan, L.W. Torley, K.H. Grabstein, J. Eisenmann, R. Paxton, T. Cox, M.M. Wick, and S.S. Kerwar. 1995. Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2. *Cell. Immunol.* 165:289–93. doi:10.1006/cimm.1995.1216.

Musolino, A., N. Naldi, B. Bortesi, D. Pezzuolo, M. Capelletti, G. Missale, D. Laccabue, A. Zerbini, R. Camisa, G. Bisagni, T.M. Neri, and A. Ardizzoni. 2008. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26:1789–96. doi:10.1200/JCO.2007.14.8957.

Nagler, A., L.L. Lanier, S. Cwirla, and J.H. Phillips. 1989. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.* 143:3183–91.

Navarro, F., M. Llano, T. Bellón, M. Colonna, D.E. Geraghty, and M. López-Botet. 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.* 29:277–83. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<277::AID-IMMU277>3.0.CO;2-4.

Nicoll, G., T. Avril, K. Lock, K. Furukawa, N. Bovin, and P.R. Crocker. 2003. Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity via siglec-7-dependent and -independent mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 33:1642–8. doi:10.1002/eji.200323693.

Nieto, A., R. Cáliz, M. Pascual, L. Matarán, S. García, and J. Martín. 2000. Involvement of Fcγ receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:735–9. doi:10.1002/1529-0131(200004)43:4<735::AID-ANR3>3.0.CO;2-Q.

Nimmerjahn, F., P. Bruhns, K. Horiuchi, and J. V Ravetch. 2005. FcγR4: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity.* 23:41–51. doi:10.1016/j.immuni.2005.05.010.

Nimmerjahn, F., and J. V Ravetch. 2010. Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunol. Rev.* 236:265–75. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00910.x.

Ober, R.J. 2001. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int. Immunol.* 13:1551–1559. doi:10.1093/intimm/13.12.1551.

Occhino, M., F. Ghiotto, S. Soro, M. Mortarino, S. Bosi, M. Maffei, S. Bruno, M. Nardini, M. Figini, A. Tramontano, and E. Ciccone. 2008. Dissecting the structural determinants of the interaction between the human cytomegalovirus UL18 protein and the CD85j immune receptor. *J. Immunol.* 180:957–68.

Ogasawara, K., and L.L. Lanier. 2005. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J. Clin. Immunol.* 25:534–40. doi:10.1007/s10875-005-8786-4.

Paez, D., L. Paré, I. Espinosa, J. Salazar, E. del Rio, A. Barnadas, E. Marcuello, and M. Baiget. 2010. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy? *Cancer Sci.* 101:2048–53. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01621.x.

Pan, D., and G.M. Rubin. 1997. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell*. 90:271–80.

Parham, P. 2005a. Influence of KIR diversity on human immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 560:47–50. doi:10.1007/0-387-24180-9_6.

Parham, P. 2005b. Influence of KIR diversity on human immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 560:47–50. doi:10.1007/0-387-24180-9_6.

Parolini, S., A. Santoro, E. Marcenaro, W. Luini, L. Massardi, F. Facchetti, D. Communi, M. Parmentier, A. Majorana, M. Sironi, G. Tabellini, A. Moretta, and S. Sozzani. 2007. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood*. 109:3625–32. doi:10.1182/blood-2006-08-038844.

Pasche, N., and D. Neri. 2012. Immunocytokines: a novel class of potent armed antibodies. *Drug Discov. Today*. 17:583–90. doi:10.1016/j.drudis.2012.01.007.

Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 74:2527–34.

Peiretti, F., M. Canault, P. Morange, M. Alessi, and G. Nalbone. 2009. [The two sides of ADAM17 in inflammation: implications in atherosclerosis and obesity]. *Med. Sci. (Paris)*. 25:45–50. doi:10.1051/medsci/200925145.

Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 1999. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 190:1505–16.

Peruzzi, G., L. Femnou, A. Gil-Krzewska, F. Borrego, J. Weck, K. Krzewski, and J.E. Coligan. 2013. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase regulates the activation-induced downmodulation of CD16 in human primary NK cells. *J. Immunol.* 191:1883–94. doi:10.4049/jimmunol.1300313.

Pessino, A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni, and A. Moretta. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 188:953–60.

Pogge von Strandmann, E., V.R. Simhadri, B. von Tresckow, S. Sasse, K.S. Reinert, H.P. Hansen, A. Rothe, B. Böll, V.L. Simhadri, P. Borchmann, P.J. McKinnon, M. Hallek, and A. Engert. 2007. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*. 27:965–74. doi:10.1016/j.immuni.2007.10.010.

Poli, A., T. Michel, M. Thérésine, E. Andrès, F. Hentges, and J. Zimmer. 2009. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*. 126:458–65. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x.

Presta, L.G., H. Chen, S.J. O'Connor, V. Chisholm, Y.G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, and N. Ferrara. 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 57:4593–9.

Primakoff, P., and D.G. Myles. 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* 16:83–7.

Ranson, T., C.A.J. Vosshenrich, E. Corcuff, O. Richard, W. Müller, and J.P. Di Santo. 2003. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood.* 101:4887–93. doi:10.1182/blood-2002-11-3392.

Raulet, D.H. 2006. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin. Immunol.* 18:145–50. doi:10.1016/j.smim.2006.03.003.

Raulet, D.H., and R.E. Vance. 2006. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* 6:520–31. doi:10.1038/nri1863.

Ravetch, J. V, and S. Bolland. 2001. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19:275–90. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.275.

Ravetch, J. V, and B. Perussia. 1989. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J. Exp. Med.* 170:481–97.

Reddy, P., J.L. Slack, R. Davis, D.P. Cerretti, C.J. Kozlosky, R.A. Blanton, D. Shows, J.J. Peschon, and R.A. Black. 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 275:14608–14.

Reff, M.E., K. Carner, K.S. Chambers, P.C. Chinn, J.E. Leonard, R. Raab, R.A. Newman, N. Hanna, and D.R. Anderson. 1994. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood.* 83:435–45.

Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Théry, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena. 1999. Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189:371–80.

Reiss, K., and P. Saftig. 2009. The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20:126–37. doi:10.1016/j.semcdb.2008.11.002.

Reyburn, H.T., O. Mandelboim, M. Valés-Gómez, D.M. Davis, L. Pazmany, and J.L. Strominger. 1997. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature.* 386:514–7. doi:10.1038/386514a0.

Richards, J.O., S. Karki, G.A. Lazar, H. Chen, W. Dang, and J.R. Desjarlais. 2008. Optimization of antibody binding to FcgammaRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 7:2517–27. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0201.

Robertson, M.J., and J. Ritz. 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 76:2421–38.

Romagnani, C., K. Juelke, M. Falco, B. Morandi, A. D'Agostino, R. Costa, G. Ratto, G. Forte, P. Carrega, G. Lui, R. Conte, T. Strowig, A. Moretta, C. Münz, A. Thiel, L. Moretta, and G. Ferlazzo. 2007. CD56brightCD16⁻ killer Ig-like receptor⁻ NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J. Immunol.* 178:4947–55.

Romagné, F., P. André, P. Spee, S. Zahn, N. Anfossi, L. Gauthier, M. Capanni, L. Ruggeri, D.M. Benson, B.W. Blaser, M. Della Chiesa, A. Moretta, E. Vivier, M.A. Caligiuri, A. Velardi, and N. Wagtmann. 2009. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood*. 114:2667–77. doi:10.1182/blood-2009-02-206532.

Romee, R., B. Foley, T. Lenvik, Y. Wang, B. Zhang, D. Ankarlo, X. Luo, S. Cooley, M. Verneris, B. Walcheck, and J. Miller. 2013. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*. doi:10.1182/blood-2012-04-425397.

De Romeuf, C., C.-A. Dutertre, M. Le Garff-Tavernier, N. Fournier, C. Gaucher, A. Glacet, S. Jorieux, N. Bihoreau, C.K. Behrens, R. Béliard, V. Vieillard, B. Cazin, D. Bourel, J.-F. Prost, J.-L. Teillaud, and H. Merle-Béral. 2008. Chronic lymphocytic leukaemia cells are efficiently killed by an anti-CD20 monoclonal antibody selected for improved engagement of Fcγ₃RIIIA/CD16. *Br. J. Haematol.* 140:635–43. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06974.x.

Roopenian, D.C., and S. Akilesh. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 7:715–25. doi:10.1038/nri2155.

Rose-John, S. 2013. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets. *Pharmacol. Res.* 71C:19–22. doi:10.1016/j.phrs.2013.01.012.

Rosental, B., M. Brusilovsky, U. Hadad, D. Oz, M.Y. Appel, F. Afergan, R. Yossef, L.A. Rosenberg, A. Aharoni, A. Cerwenka, K.S. Campbell, A. Braiman, and A. Porgador. 2011. Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J. Immunol.* 187:5693–702. doi:10.4049/jimmunol.1102267.

Rubinstein, M.P., M. Kovar, J.F. Purton, J.-H. Cho, O. Boyman, C.D. Surh, and J. Sprent. 2006. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R{α}. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:9166–71. doi:10.1073/pnas.0600240103.

Salmon, J.E., J.C. Edberg, and R.P. Kimberly. 1990. Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J. Clin. Invest.* 85:1287–95. doi:10.1172/JCI114566.

Salmon, J.E., R.P. Kimberly, A. Gibofsky, and M. Fotino. 1984. Defective mononuclear phagocyte function in systemic lupus erythematosus: dissociation of Fc receptor-ligand binding and internalization. *J. Immunol.* 133:2525–31.

Di Santo, J.P., and C.A.J. Voshenrich. 2006. Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol. Rev.* 214:35–46. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00461.x.

Sautès, C., C. Teillaud, N. Mazières, E. Tartour, C. Bouchard, A. Galinha, M. Jourde, R. Spagnoli, and W.H. Fridman. 1992. Soluble Fc gamma R (sFc gamma R): detection in biological fluids and production of a murine recombinant sFc gamma R biologically active in vitro and in vivo. *Immunobiology.* 185:207–21.

Saverino, D., M. Fabbi, F. Ghiotto, A. Merlo, S. Bruno, D. Zarcone, C. Tenca, M. Tiso, G. Santoro, G. Anastasi, D. Cosman, C.E. Grossi, and E. Ciccone. 2000. The CD85/LIR-1/ILT2 inhibitory receptor is expressed by all human T lymphocytes and down-regulates their functions. *J. Immunol.* 165:3742–55.

Scallon, B.J., E. Scigliano, V.H. Freedman, M.C. Miedel, Y.C. Pan, J.C. Unkeless, and J.P. Kochan. 1989. A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide-anchored and phosphatidylinositol-glycan-anchored forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:5079–83.

Schönberg, K., M. Sribar, J. Enczmann, J.C. Fischer, and M. Uhrberg. 2011. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood.* 117:98–107. doi:10.1182/blood-2010-03-273656.

Selvaraj, P., W.F. Rosse, R. Silber, and T.A. Springer. 1988. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature.* 333:565–7. doi:10.1038/333565a0.

Shibuya, A., D. Campbell, C. Hannum, H. Yssel, K. Franz-Bacon, T. McClanahan, T. Kitamura, J. Nicholl, G.R. Sutherland, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1996. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity.* 4:573–81.

Shields, R.L., A.K. Namenuk, K. Hong, Y.G. Meng, J. Rae, J. Briggs, D. Xie, J. Lai, A. Stadlen, B. Li, J.A. Fox, and L.G. Presta. 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* 276:6591–604. doi:10.1074/jbc.M009483200.

Shilling, H.G., K.L. McQueen, N.W. Cheng, J.A. Shizuru, R.S. Negrin, and P. Parham. 2003. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 101:3730–40. doi:10.1182/blood-2002-08-2568.

Singh, R.J.R., J.C. Mason, E.A. Lidington, D.R. Edwards, R.K. Nuttall, R. Khokha, V. Knauper, G. Murphy, and J. Gavrilovic. 2005. Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ectodomain release is regulated by TIMP-3. *Cardiovasc. Res.* 67:39–49. doi:10.1016/j.cardiores.2005.02.020.

Skrzeczyńska-Moncznik, J., M. Bzowska, S. Loseke, E. Grage-Griebenow, M. Zembala, and J. Pryjma. 2008. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* 67:152–9. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x.

Sliwkowski, M.X., G. Schaefer, R.W. Akita, J.A. Lofgren, V.D. Fitzpatrick, A. Nuijens, B.M. Fendly, R.A. Cerione, R.L. Vandlen, and K.L. Carraway. 1994. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.* 269:14661–5.

Smith, M.R. 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*. 22:7359–68. doi:10.1038/sj.onc.1206939.

Sondermann, P., R. Huber, V. Oosthuizen, and U. Jacob. 2000. The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature*. 406:267–73. doi:10.1038/35018508.

Spear, P., M.-R. Wu, M.-L. Sentman, and C.L. Sentman. 2013. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun.* 13:8.

Spits, H., and J.P. Di Santo. 2011. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat. Immunol.* 12:21–7. doi:10.1038/ni.1962.

Springman, E.B., E.L. Angleton, H. Birkedal-Hansen, and H.E. Van Wart. 1990. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a “cysteine switch” mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:364–8.

Stavenhagen, J.B., S. Gorlatov, N. Tuailon, C.T. Rankin, H. Li, S. Burke, L. Huang, S. Vijh, S. Johnson, E. Bonvini, and S. Koenig. 2007. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fc gamma receptors. *Cancer Res.* 67:8882–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0696.

Stebbins, C.C., C. Watzl, D.D. Billadeau, P.J. Leibson, D.N. Burshtyn, and E.O. Long. 2003. Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol. Cell. Biol.* 23:6291–9.

Stoklasek, T.A., K.S. Schluns, and L. Lefrançois. 2006. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J. Immunol.* 177:6072–80.

Tahara-Hanaoka, S., K. Shibuya, Y. Onoda, H. Zhang, S. Yamazaki, A. Miyamoto, S.-I. Honda, L.L. Lanier, and A. Shibuya. 2004. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int. Immunol.* 16:533–8.

Taylor, R.J., S.-L. Chan, A. Wood, C.J. Voskens, J.S. Wolf, W. Lin, A. Chapoval, D.H. Schulze, G. Tian, and S.E. Strome. 2009. Fc gammaRIIIa polymorphisms and cetuximab induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:997–1006. doi:10.1007/s00262-008-0613-3.

Teeling, J.L., R.R. French, M.S. Cragg, J. van den Brakel, M. Pluyter, H. Huang, C. Chan, P.W.H.I. Parren, C.E. Hack, M. Dechant, T. Valerius, J.G.J. van de Winkel, and M.J. Glennie. 2004. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic

activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 104:1793–800. doi:10.1182/blood-2004-01-0039.

Teeling, J.L., W.J.M. Mackus, L.J.J.M. Wiegman, J.H.N. van den Brakel, S.A. Beers, R.R. French, T. van Meerten, S. Ebeling, T. Vink, J.W. Slootstra, P.W.H.I. Parren, M.J. Glennie, and J.G.J. van de Winkel. 2006. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol.* 177:362–71.

Teillaud, J.L., C. Bouchard, A. Astier, C. Teillaud, E. Tartour, J. Michon, A. Galinha, J. Moncuit, N. Mazières, and R. Spagnoli. 1994. Natural and recombinant soluble low-affinity Fc gamma R: detection, purification, and functional activities. *Immunomethods*. 4:48–64.

Van Tetering, G., P. van Diest, I. Verlaan, E. van der Wall, R. Kopan, and M. Vooijs. 2009. Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *J. Biol. Chem.* 284:31018–27. doi:10.1074/jbc.M109.006775.

Thomas, M., J.M. Boname, S. Field, S. Nejentsev, M. Salio, V. Cerundolo, M. Wills, and P.J. Lehner. 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.* 105:1656–61. doi:10.1073/pnas.0707883105.

Tomasello, E., M. Bléry, F. Vély, and E. Vivier. 2000. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin. Immunol.* 12:139–47. doi:10.1006/smim.2000.0216.

Tomescu, C., J. Chehimi, V.C. Maino, and L.J. Montaner. 2009. Retention of viability, cytotoxicity, and response to IL-2, IL-15, or IFN-alpha by human NK cells after CD107a degranulation. *J. Leukoc. Biol.* 85:871–6. doi:10.1189/jlb.1008635.

Treon, S.P., M. Hansen, A.R. Branagan, S. Verselis, C. Emmanouilides, E. Kimby, S.R. Frankel, N. Touroutoglou, B. Turnbull, K.C. Anderson, D.G. Maloney, and E.A. Fox. 2005. Polymorphisms in FcgammaRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *J. Clin. Oncol.* 23:474–81. doi:10.1200/JCO.2005.06.059.

Valés-Gómez, M., H.T. Reyburn, R.A. Erskine, M. López-Botet, and J.L. Strominger. 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.* 18:4250–60. doi:10.1093/emboj/18.15.4250.

Valiante, N.M., M. Uhrberg, H.G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K.L. Arnett, A. D'Andrea, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and P. Parham. 1997. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*. 7:739–51.

Varchetta, S., N. Gibelli, B. Oliviero, E. Nardini, R. Gennari, G. Gatti, L.S. Silva, L. Villani, E. Tagliabue, S. Ménard, A. Costa, and F.F. Fagnoni. 2007. Elements related to heterogeneity of antibody-dependent cell cytotoxicity in patients under trastuzumab therapy for primary operable breast cancer overexpressing Her2. *Cancer Res.* 67:11991–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2068.

Veeramani, S., S.-Y. Wang, C. Dahle, S. Blackwell, L. Jacobus, T. Knutson, A. Button, B.K. Link, and G.J. Weiner. 2011. Rituximab infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism. *Blood*. 118:3347–9. doi:10.1182/blood-2011-05-351411.

Veri, M.-C., S. Gorlatov, H. Li, S. Burke, S. Johnson, J. Stavenhagen, K.E. Stein, E. Bonvini, and S. Koenig. 2007. Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcγ-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcγ-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology*. 121:392–404. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02588.x.

Verma, S., D. Miles, L. Gianni, I.E. Krop, M. Welslau, J. Baselga, M. Pegram, D.-Y. Oh, V. Diéras, E. Guardino, L. Fang, M.W. Lu, S. Olsen, and K. Blackwell. 2012. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 367:1783–91. doi:10.1056/NEJMoa1209124.

Vincent, M., A. Bessard, D. Cochonneau, G. Teppaz, V. Solé, M. Maillason, S. Birklé, L. Garrigue-Antar, A. Quémener, and Y. Jacques. 2013a. Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency. *Int. J. Cancer*. 133:757–65. doi:10.1002/ijc.28059.

Vincent, M., A. Quémener, and Y. Jacques. 2013b. Antitumor activity of an immunocytokine composed of an anti-GD2 antibody and the IL-15 superagonist RLI. *Oncoimmunology*. 2:e26441. doi:10.4161/onci.26441.

Vincent, M., A. Quémener, and Y. Jacques. 2013c. Antitumor activity of an immunocytokine composed of an anti-GD2 antibody and the IL-15 superagonist RLI. *Oncoimmunology*. 2:e26441. doi:10.4161/onci.26441.

Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, and A. Moretta. 1998. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* 187:2065–72.

Vitale, M., M. Falco, R. Castriconi, S. Parolini, R. Zambello, G. Semenzato, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 2001. Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 31:233–42. doi:10.1002/1521-4141(200101)31:1<233::AID-IMMU233>3.0.CO;2-4.

Vivier, E., J.A. Nunès, and F. Vély. 2004. Natural killer cell signaling pathways. *Science*. 306:1517–9. doi:10.1126/science.1103478.

Vivier, E., D.H. Raulet, A. Moretta, M.A. Caligiuri, L. Zitvogel, L.L. Lanier, W.M. Yokoyama, and S. Ugolini. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 331:44–9. doi:10.1126/science.1198687.

Walcheck, B., A.H. Herrera, C. St Hill, P.E. Mattila, A.R. Whitney, and F.R. Deleo. 2006. ADAM17 activity during human neutrophil activation and apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 36:968–76. doi:10.1002/eji.200535257.

Walzer, T., M. Bléry, J. Chaix, N. Fuseri, L. Chasson, S.H. Robbins, S. Jaeger, P. André, L. Gauthier, L. Daniel, K. Chemin, Y. Morel, M. Dalod, J. Imbert, M. Pierres, A. Moretta, F. Romagné, and E. Vivier. 2007. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:3384–9. doi:10.1073/pnas.0609692104.

Wang, H., J.S. Davis, and X. Wu. 2014. Immunoglobulin Fc Domain Fusion to TRAIL Significantly Prolongs Its Plasma Half-Life and Enhances Its Antitumor Activity. *Mol. Cancer Ther.* doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0645.

Wang, Y., J. Wu, R. Newton, N.S. Bahaie, C. Long, and B. Walcheck. 2012. ADAM17 cleaves CD16b (FcγRIIIb) in human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta.* doi:10.1016/j.bbamcr.2012.11.027.

Warmerdam, P.A., N.M. Nabben, S.A. van de Graaf, J.G. van de Winkel, and P.J. Capel. 1993. The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result of an unequal crossover event. *J. Biol. Chem.* 268:7346–9.

Van Wart, H.E., and H. Birkedal-Hansen. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:5578–82.

Welte, S., S. Kuttruff, I. Waldhauer, and A. Steinle. 2006. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat. Immunol.* 7:1334–42. doi:10.1038/ni1402.

Weng, W.-K., and R. Levy. 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 21:3940–7. doi:10.1200/JCO.2003.05.013.

Wheeler, D.L., S. Huang, T.J. Kruser, M.M. Nechrebecki, E.A. Armstrong, S. Benavente, V. Gondi, K.-T. Hsu, and P.M. Harari. 2008. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene.* 27:3944–56. doi:10.1038/onc.2008.19.

Wheeler, D.L., M. Iida, T.J. Kruser, M.M. Nechrebecki, E.F. Dunn, E.A. Armstrong, S. Huang, and P.M. Harari. 2009. Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab. *Cancer Biol. Ther.* 8:696–703.

Wiernik, A., B. Foley, B. Zhang, M.R. Verneris, E. Warlick, M.K. Gleason, J.A. Ross, X. Luo, D.J. Weisdorf, B. Walcheck, D.A. Vallera, and J.S. Miller. 2013. Targeting natural killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16 x 33 bispecific killer cell engager and ADAM17 inhibition. *Clin. Cancer Res.* 19:3844–55. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0505.

Wu, J., J.C. Edberg, P.B. Redecha, V. Bansal, P.M. Guyre, K. Coleman, J.E. Salmon, and R.P. Kimberly. 1997. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 100:1059–70. doi:10.1172/JCI119616.

Wu, J., Y. Song, A.B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*. 285:730–2.

Yan, Y., K. Shirakabe, and Z. Werb. 2002. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J. Cell Biol.* 158:221–6. doi:10.1083/jcb.200112026.

Yang, P., K.A. Baker, and T. Hagg. 2006. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. *Prog. Neurobiol.* 79:73–94. doi:10.1016/j.pneurobio.2006.05.001.

Yawata, M., N. Yawata, M. Draghi, A.-M. Little, F. Partheniou, and P. Parham. 2006. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J. Exp. Med.* 203:633–45. doi:10.1084/jem.20051884.

Yawata, M., N. Yawata, M. Draghi, F. Partheniou, A.-M. Little, and P. Parham. 2008. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood*. 112:2369–80. doi:10.1182/blood-2008-03-143727.

Yokoyama, W.M. 2008. Inhibitory receptors signal activation. *Immunity*. 29:515–7. doi:10.1016/j.immuni.2008.09.009.

Yokoyama, W.M., and S. Kim. 2006. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol. Rev.* 214:143–154. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x.

Yu, J., G. Heller, J. Chewning, S. Kim, W.M. Yokoyama, and K.C. Hsu. 2007. Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *J. Immunol.* 179:5977–89.

Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D.F. Tough, and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity*. 8:591–9.

Ziegler-Heitbrock, L. 2007. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 81:584–92. doi:10.1189/jlb.0806510.

Annexe 1 : Article n°3

Highly potent anti-CD20-RLI immunocytokine targeting established human B lymphoma in SCID mouse

Vincent M, Teppaz G, **Lajoie L**, Solé V, Bressard A, Loisel S, Bécharde D, Clémenceau B, Thibault G, Garrigue-Antar L, Jacques Y, Quémener A. *MAbs*. 2014

Highly potent anti-CD20-RLI immunocytokine targeting established human B lymphoma in SCID mouse

Marie Vincent¹, Géraldine Teppaz¹, Laurie Lajoie², Véronique Solé¹, Anne Bessard¹, Mike Maillasson¹, Séverine Loisel³, David Béchar⁴, Béatrice Clémenceau⁵, Gilles Thibault², Laure Garrigue-Antar¹, Yannick Jacques^{1*} and Agnès Quémener^{1*}.

¹ UMR892-INSERM 6299-CNRS, Université de Nantes, équipe Cytokines et Récepteurs en Immuno-Cancérologie, F-44007, Nantes, France.

² UMR7292-CNRS, Université François Rabelais de Tours and Centre Hospitalier Universitaire de Tours, Laboratoire d'Immunologie, F-37032, Tours, France.

³ EA2216 and IFR148, University Medical School, Université Européenne de Bretagne, F-9238 Brest, France.

⁴ Cytune Pharma SAS, 7 Rue Amédée Ménard, 44300 Nantes, France.

⁵ UMR892-INSERM 6299-CNRS, Université de Nantes, équipe Immunothérapie, F-44007, Nantes, France, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes; Nantes, France.

* Y.J. and A.Q. contributed equally to this work.

Corresponding authors: Agnès QUEMENER and Yannick JACQUES, UMR 892-INSERM 6299-CNRS, Groupe de Recherche Cytokines et Récepteurs en Immuno-Hématologie, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, 8 Quai Moncousu, BP 70721, F-44007 Nantes cedex 1, France. Phone: +33 22808 0305 and +33228080315. Fax: +33 22808 0204. E-mail: agnes.quemener@inserm.fr and Yannick.Jacques@univ-nantes.fr.

26 **Running title:** RLI-based immunocytokine targeting CD20.

27 **Keywords:** interleukin-15, CD20, Rituximab, immunocytokine, cancer therapy, lymphoma, B

28 cell malignancies.

29 **Abbreviations:** RTX: rituximab; ICK: immunocytokine; ADCC: antibody-dependent cellular

30 cytotoxicity; CDC: complement-dependent cytotoxicity; NHL: follicular non-Hodgkin's

31 lymphoma; CLL: chronic lymphocytic leukemia; SCID: severe combined immunodeficiency;

32 IL: interleukin; mAb: monoclonal antibody; p-STAT5: phospho-STAT5; R: reducing; NR:

33 non-reducing; SPR: surface plasmon resonance.

Abstract

Rituximab (RTX), a chimeric IgG1 monoclonal antibody directed against the CD20 antigen, has revolutionized the treatment of B-cell malignancies. Nevertheless, the relapsed/refractory rates are still high. One strategy to increase the clinical effectiveness of RTX is based on antibody-cytokine fusion protein (immunocytokine; ICK) vectorizing together at the tumor site the antibody effector activities and the cytokine co-signal required for the generation of cytotoxic cellular immunity. Such ICKs linking various antibody formats to interleukin (IL)-2 are currently being investigated in clinical trials and have shown promising results in cancer therapies. IL-15, a structurally-related cytokine, is now considered as having a better potential than IL-2 in antitumor immunotherapeutic strategies. We have previously engineered the fusion protein RLI, linking a soluble form of human IL-15R α -sushi+ domain to human IL-15. Compared to IL-15, RLI displayed better biological activities in vitro and higher antitumor effects in vivo in murine and human cancer models. In this study, we investigated the advantages of fusing RLI to RTX. Anti-CD20-RLI kept its binding capacity to CD20, CD16 and IL-15 receptor and therefore fully retained both antibody effector functions (ADCC and CDC), and the cytokine potential of RLI. In a severe combined immunodeficiency (SCID) mouse model of disseminated residual lymphoma, anti-CD20-RLI was found to induce long-term survival of 90% of mice up to at least 120 days whereas RLI and RTX, alone or in combination, just delayed the disease onset (100% of death at 28, 40 and 51 days respectively). These findings suggest that such ICK could improve the clinical efficacy of RTX, particularly in patients with refractory B-cell lymphoma.

59

60

Introduction

61

62 Rituximab (RTX), a chimeric monoclonal antibody (mAb) directed against the CD20
63 antigen, is currently used associated with chemotherapy for the treatment of follicular non-
64 Hodgkin's lymphoma (NHL), diffuse large B cell lymphoma¹ and chronic lymphocytic
65 leukemia (CLL).² CD20 is a non-glycosylated trans-membrane protein of 33 to 37kDa that is
66 expressed on the surface of normal B cells from pre-B to mature-B cell stage, but not on
67 hematopoietic stem cells, progenitor B cells or plasmocytes.³ In B cell malignancies, like B
68 cell NHL, CD20 is highly expressed. Because CD20 is not down-modulated and rarely shed,⁴
69 it represents a good target for antibody-based immunotherapy. RTX binding to CD20 can lead
70 to cell lysis through several mechanisms including apoptosis, antibody dependent cell-
71 mediated cytotoxicity (ADCC), phagocytosis and complement-mediated cytotoxicity (CDC).⁵
72 Relapse or absence of clinical response after RTX treatment is however significant, and ~ half
73 of the patients who receive it do not respond to RTX treatment, probably because of the
74 development by B cells of RTX resistance, including a decrease of ADCC or CDC.^{6,7} Thus,
75 several studies have aimed at enhancing the functional activities of anti-CD20 antibodies by
76 increasing their binding to CD16a (FcγRIIIa),^{8,9} a receptor responsible for ADCC and
77 expressed on NK cells, neutrophils and macrophages.¹⁰

78 An alternative approach to increase the effects of RTX is based on its combination
79 with agents that stimulate ADCC-competent immune effector cells. Interleukin (IL)-2 is one
80 of these agents; it is a potent stimulator of both T and NK cells, and has already been tested in
81 association with RTX in pre- and Phase 1 clinical studies.^{11,12} In such a context, an antibody-
82 cytokine fusion protein (immunocytokine; ICK) linking an anti-CD20 antibody to IL-2 has
83 been developed and was shown to display higher antitumor activity compared to the

corresponding naked antibody, in a severe combined immunodeficient (SCID) mouse model of disseminated residual human lymphoma.¹³

Among the most advanced ICKs targeting tumor antigens and using various pro-inflammatory cytokines, those based on IL-2 have shown promising results in Phase 2 clinical trials, but with adverse effects resembling the ones observed with recombinant IL-2.^{14,15} Although displaying similar in vitro effects, IL-15, a cytokine structurally related to IL-2, is considered as having a better potential in antitumor immunotherapeutic strategies, and has been shown to be 6 times less toxic than IL-2 in preclinical studies.¹⁶ To mediate its actions, IL-15 binds to a receptor that shares with the IL-2 receptor the IL-2/IL-15R β and common γ chains as transducing components. In addition, IL-2 and IL-15 each uses a private α chain (IL-2R α and IL-15R α) that confers cytokine specificity and enhances the affinity of cytokine binding.^{17,18} The mechanism of action of IL-15 in vivo, playing a major role in tumor immunosurveillance, relies on its *trans*-presentation by IL-15 producer cells expressing IL-15R α (dendritic cells, macrophages and epithelial cells) to responder cells (NK or memory CD8⁺ T cells) bearing the IL-15R β / γ receptor.¹⁹⁻²¹ IL-15 is particularly crucial for the development of innate immune cells, the cellular activation of T and NK cells, and the survival of CD8⁺ memory T cells.^{22,23} Unlike IL-2, IL-15 does not induce activation-induced cell death (AICD) of CD8⁺ effectors cells²⁴ and does not seem to exert an important influence on regulatory T cells that can dampen the antitumor immune responses.²⁵ Furthermore, IL-15 has been shown to increase the ADCC activity of RTX against a lymphoma B cell line and against lymphoma cells from CLL patients.^{26,27} Recently, IL-15 *trans*-presentation by B leukemic cells from CLL patients has been demonstrated in vitro and was shown to stimulate and expand autologous NK cells and to lead to B leukemic cell depletion, a process greatly amplified in the presence of mAbs such as RTX or GA101 (an optimized anti-CD20 antibody).²⁸

We previously described the existence of a soluble form of the human IL-15R α that results from the proteolytic cleavage of membrane-anchored IL-15R α by metalloproteases.²⁹ Several studies have subsequently revealed the higher stimulatory effects of soluble IL-15R α /IL-15 complexes over IL-15 alone in vitro and in vivo.³⁰⁻³² Accordingly, we previously engineered a fusion protein (RLI), that consists of the NH2-terminal (amino acids 1-77, sushi+) domain of IL-15R α linked *via* a 20-amino acid linker to IL-15.³³ RLI was shown to exert higher biological activities than IL-15 or even the non-covalent association of IL-15 with the soluble IL-15R α to drive in vitro cell proliferation through the IL-15R β / γ receptor,³⁴ and to promote in vivo mobilization and expansion of NK cells.³⁵ Moreover, when injected in mice, RLI displayed an increased serum half-life compared to IL-15 and revealed strong antitumor effects depending mainly on the NK cell subset, in systemic B16 melanoma mouse model and human HCT-116 colorectal cancer.³⁶

We therefore aimed at engineering RLI-based ICKs that could combine the tumor targeting and cytotoxic properties of therapeutic mAbs, and the immune stimulating potencies of RLI (Fig. 1). Such an ICK was first built on the basis of an antibody targeting GD2, a sialic acid-bearing glycosphingolipids expressed on many human neuroectodermal tumors. Anti-GD2-RLI was shown to extend mice survival in a lymphoma mouse model and to decrease metastatic progression in a syngenic immunocompetent murine model of cancer.³⁷ Here, we describe the biological activities in vitro and the high anti-tumor potencies in vivo of a RLI-based ICK targeting the CD20 antigen, highlighting the potential therapeutic benefit of such fusion proteins in B cell malignancies.

133

134

Results

135

136 *Characterization of the anti-CD20-RLI ICK:*

137 ICK construction is depicted in Figure 2A. The anti-CD20-RLI ICK was produced in
138 transiently transfected CHO cells and purified by Protein A affinity chromatography. SDS-
139 PAGE analysis under non-reducing (NR) conditions revealed major bands of 150 and 200
140 kDa for RTX and anti-CD20-RLI respectively, corresponding to the predicted molecular
141 masses of the antibody and the fusion protein, with similar high degrees of purity (Fig. 2B left
142 panel). SDS-PAGE under reducing (R) conditions revealed two bands of 75 and 25kDa
143 corresponding respectively to the heavy chain of RTX fused with RLI and the light chain of
144 RTX (Fig. 2B, middle panel). The identity of anti-CD20-RLI heavy and light chains was
145 further established by Western blot analysis with an anti-IgG mAb (Fig. 2B, right panel, line
146 1) and the anti-IL-15 B-E29 mAb (Fig. 2B, right panel, line 2, heavy chain). The gel-filtration
147 profile under native conditions showed that the recombinant fusion protein is mainly a
148 monomer with some little propensity of dimer and trimer formation (Fig. 2C).

149 Binding of anti-CD20-RLI to CD20 and IL-15R was analyzed by flow cytometry. It bound to
150 CD20⁺ Raji cells with a similar mean binding level as RTX (Fig.3A, left panel). Raji cells did
151 not bind the irrelevant anti-GD2-RLI ICK, excluding that part of the anti-CD20-RLI reactivity
152 was through its cytokine moiety. Anti-CD20-RLI was also able to bind to Kit225 cells that
153 express endogenous IL-15R α , IL-15R β and IL-15R γ chains (Fig. 3A, middle panel) and to
154 32D β cells that express endogenous IL-15R β and IL-15R γ chains (Fig. 3A, right panel). By
155 contrast, no binding was detected for RTX, indicating in that case that anti-CD20-RLI bound
156 through its cytokine moiety.

Binding of anti-CD20-RLI ICK to FcγRIIIa (CD16a) expressed on the surface of NK-92-CD16⁺ cells³⁸ was also studied and compared to that of RTX. It was evaluated by measuring the inhibition of the binding of the FITC-conjugated anti-CD16a mAb 3G8 to NK-92-CD16⁺ cells. Similar inhibition curves were obtained with anti-CD20-RLI, RTX alone or in association with RLI (Fig. 3B), 80% inhibitory effects being achieved with 10 μM of mAbs. By contrast, RLI did not affect the binding of 3G8 mAb to CD16a (Fig. 3B).

Kinetic analysis by surface plasmon resonance (SPR) of the binding of anti-CD20-RLI to soluble immobilized IL-15Rβ/γ complex (Fig. 3C) was also performed and compared to that of RLI. As expected, RLI bound to IL-15Rβ/γ with an affinity in the nanomolar range ($k_{on} = 3.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} = 7.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $K_d = 2.2 \text{ nM}$). The anti-CD20-RLI also bound to IL-15Rβ/γ, but with an about 3-fold-higher affinity mainly due to a decrease in the off rate ($k_{on} = 2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} = 1.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $K_d = 0.72 \text{ nM}$).

Cytokine activities:

In agreement with previous reports,^{33,34,39} IL-15 and RLI induced the proliferation of Kit225 cells through IL-15Rα/β/γ at similar low concentrations ($ED_{50} \approx 80$ and 35 pM, respectively) (Fig. 4A). On these cells, anti-CD20-RLI showed a dose-response effect similar to that of RLI ($ED_{50} \approx 36$ pM). On 32Dβ cells that express IL-15Rβ/γ, and as expected from our previous reports,³⁷ RLI was about 10-fold more efficient than IL-15 in inducing proliferation ($ED_{50} = 122$ vs 1259 pM respectively, Fig. 4B). In this case, the anti-CD20-RLI ICK was found to exhibit an even higher (7-fold) potency ($ED_{50} = 18$ pM) than RLI. A similar increased potency over RLI was already found in the case of anti-GD2-RLI, another RLI-based ICK.³⁷ Any potential participation of the anti-CD20 moiety of the ICK in its higher activity was ruled out by the fact that: (1) 32Dβ cells did not express CD20 under flow cytometric analysis; (2) RTX

alone did not induce their proliferation; (3) the effect of the ICK was not modified by a saturating concentration of RTX (100 nM) (not shown).

Detection of STAT5 phosphorylation in 32D β cells

Phosphorylation of STAT5 was evaluated in 32D β cells, stimulated either with IL-15, RLI or anti-CD20-RLI. Consistent with our proliferation results, RLI was about 12-fold more efficient than IL-15 in inducing the phosphorylation of STAT5 (ED_{50} = 196 vs 2475 pM, respectively, Fig. 4C), and the anti-CD20-RLI ICK was found to be 7-fold more potent than RLI (ED_{50} = 28 pM, Fig. 4C).

Antibody effectors functions:

CDC was evaluated on the CD20⁺ Daudi target cells. Cells were incubated either with RTX, anti-CD20-RLI or anti-GD2 as negative control, in the presence of human serum as a source of complement. Anti-CD20-RLI induced similar CDC as RTX (Fig. 5A). Its effect was even slightly better on a molar basis than that induced by the parental mAb. The specificity was assessed by the absence of cytotoxicity when using the irrelevant antibody anti-GD2 (Fig. 5A) and when using heat-inactivated serum (not shown). ADCC was evaluated on the CD20⁺ Raji target cells, using purified NK cells from healthy donors as effector cells. Raji cells were incubated either with RTX, RTX + RLI, anti-CD20-RLI, anti-GD2 or RLI, the latter two being used as negative controls. The effects were both effector-to-target cell (E/T) ratio-dependent (not shown) and dose-dependent (Fig. 5B). Anti-CD20-RLI induced a similar maximal ADCC as RTX alone or associated with RLI, although it was somewhat less efficient than RTX on a molar basis (EC_{50} = 26 pM vs 11 pM, respectively). No cytotoxic activity was observed with RLI, and the anti-GD2 antibody showed only background lysis, thereby demonstrating the antigen specificity of the assay.

ADCC was further investigated on CD19⁺ B cell depletion from whole blood of healthy donors. Similar dose-dependent depletion curves and maximal effects were obtained with anti-CD20-RLI and RTX (Fig. 6). CD3⁺ T cells and CD56⁺ NK cells remained unaffected, demonstrating the CD19⁺ B cell specificity of the assay (not shown). RLI did not induce CD19⁺ cells depletion, nor did it interfere with the depleting effect of RTX (Fig. 6).

The activities of ICK and RTX were further compared on NK-cell activation by measuring in vitro CD16a down-modulation and NK-cell degranulation (CD107-based assay), using PMA/CaI treatment as positive control. Anti-CD20-RLI induced 2- to 3-fold higher CD16 down-modulation (Fig.7A) and CD107 expression (Fig.7B) on isolated human NK cells than RTX, at all incubation periods studied. RLI used alone had minor or no detectable effect.

Pharmacokinetics:

Male C57BL/6 mice were injected intraperitoneally (i.p.) with a single equimolar (80 pmol) dose of anti-CD20-RLI (16 µg), or RTX (12µg) (Fig. 8 and Table 1). Plasma levels were determined using two ELISAs specific for human IgG or human IgG-IL-15 complex, respectively. For the ICK, both ELISAs gave similar results throughout the experiments, indicating that there was no significant alteration of the integrity of the anti-CD20-RLI fusion protein for at least 300 hours after i.p. administration. The pharmacokinetic profile of RTX (half-life = 100h) was in agreement with previous reports in mouse (half-life around 70h)⁴⁰ and human (half-lives of 76 to 206h).⁴¹ In comparison, anti-CD20-RLI showed a strongly reduced bioavailability. Although displaying a similar maximal peak of plasma concentration (C_{max} about 50 nM) as the parental antibody, its half-life (8.5h) and AUC (1188 nM.h) were found 6- to 12-fold lower than those of RTX (100 h and 7770 nM.h, respectively). Nevertheless, the pharmacokinetic parameters of anti-CD20-RLI were far higher than those

previously measured for RLI alone (3h and 35 nM.h),³⁶ indicating that the fusion procedure markedly enhanced the bioavailability of RLI (Table 1).

Anti-tumoral activity of anti-CD20-RLI:

The antitumoral efficacy of RTX and anti-CD20-RLI were compared in a Raji xenograft model. Raji proliferation in vitro was not affected by either IL-15 or RLI, therefore ruling out any potential direct effect of the RLI moiety on the tumor cells (data not shown). The mice survival curves were plotted according to Kaplan-Meier method and compared using log-rank test (Fig. 9). RLI alone at 2 µg did not significantly modify the median survival (23 days compared to 21 days for vehicle treated mice, Fig. 9B). RTX at an equimolar amount (12 µg) was slightly effective, by increasing the median survival rate to 27 days (Fig. 9B). Injection of a higher dose (200 µg, equivalent to 375mg/m², a dose routinely used in human)⁴² did not induce a greater effect (Fig. 9A). However, the association of RLI to RTX enhanced its protective effect (median survival of 37 days). Unexpectedly, the antigen-irrelevant anti-GD2-RLI ICK also resulted in an increase of the median survival (52 days). However, and spectacularly, treatment with the equimolar amount of anti-CD20-RLI (16µg) resulted in long-term survival of 90% of mice up to at least 120 days (Fig. 9B).

248

249

Discussion

250

251 This study shows for the first time that targeting CD20 in a disseminated human
252 lymphoma xenograft model with a RLI-based ICK almost completely cures the disease,
253 leading to long-term survival. This anti-tumoral effect is much stronger than those obtained
254 with the naked antibody RTX used at equivalent, and even much higher, doses that only
255 delayed disease onset. Similar antitumor effects have already been reported for an IL2-based
256 ICK also targeting CD20 on a SCID mouse model,¹³ but, as IL-2-based ICKs elicit adverse
257 events similar to those of IL-2,¹⁵ anti-CD20-RLI should have the advantage of a better safety
258 profile.¹⁶ Future studies are required to address this point.

259 We first showed that fusing RLI to the anti-CD20 antibody did not alter the
260 recognition of the CD20 antigen. The cytotoxic effector functions (ADCC, CDC, NK cell
261 activation) of the antibody in vitro or ex-vivo (CD19⁺ depletion) were also found to be
262 maintained, and even slightly increased in the case of CDC and NK-cell activation. This
263 suggests that fusing RLI to the antibody C-terminus did not decrease the binding of the latter
264 to Fc receptors or complement. The reason for the increased CDC activity and NK cells
265 activation remains to be understood. A direct conformational effect of RLI on C1q
266 recognition appears unlikely as the binding site of C1q on the CH2 domain of the antibody
267 heavy chain is located at a distance of its C-terminus. Concerning NK-cell activation, anti-
268 CD20-RLI and RTX were found to bind similarly to FcγRIIIa expressed by NK cells,
269 indicating that their increased activation is rather the result of a direct effect of RLI than of an
270 increased binding to Fc receptors of the antibody part of the ICK. This is also consistent with
271 the fact that the association of RLI with RTX was as effective as the ICK. This is in
272 agreement with the results from Mogga²⁷ demonstrating that the direct action of IL-15 on NK

cells was responsible for the IL-15-induced increase of RTX-mediated ADCC of PBMCs against CLL cells, and with the recent work of Laprevotte²⁸ demonstrating that NK cells from CLL patients can be stimulated and expanded by B leukemic cells *trans*-presenting recombinant human IL-15.

As previously shown for anti-GD2-RLI,³⁷ the anti-CD20-RLI ICK kept a binding capacity to cell surface IL-15 receptors, as revealed by flow cytometry. On Kit225 cells, it was found as potent as RLI in inducing cell proliferation. On 32D β cells that express the $\beta\gamma$ complex, RLI, in agreement with our previous works,^{33,37} was about 10-fold more efficient on a molar basis than IL-15 in inducing cell proliferation as well as signal transduction (STAT5 phosphorylation). In this setting that mimics IL-15 *trans*-presentation, anti-CD20-RLI was found even 7-fold more efficient than RLI both to induce STAT5 signaling and cell proliferation. This increased potential is in line with its 3-fold-higher binding affinity for a soluble IL-15R β/γ complex compared to RLI, and could reflect the ability of the ICK to engage two RLI binding moieties. As already proposed in the case of the anti-GD2-RLI,³⁷ this increased efficiency over RLI could reflect a more persistent receptor activation.

The SCID/Raji mouse model, where Raji cells have been inoculated i.v. to SCID mice, has usually been used for the investigation of various therapeutic strategies against NHL. In this model, the association of RLI to RTX in the ICK format was found to spectacularly enhance the RTX anti-tumoral effect. All mice except one receiving the ICK treatment were still alive up to at least 120 days after the inoculation of Raji cells, without any clinical sign of disease, whereas all mice receiving RTX were dead at day 35 with a mean survival of 27 days. Linking RLI to RTX in the ICK format was also essential for this high efficiency, the simple non covalent association of RLI to RTX, although synergistic, only increasing mean survival to 35 days.

Interestingly, the irrelevant ICK (anti-GD2-RLI) was shown to display substantial efficiency, suggesting that a significant part of the ICK antitumor effect is associated with a specific effect of circulating RLI. These results are in agreement with those of Gillies¹³ showing that an anti-CD20-IL-2 with decreased ADCC activity (by removal of the N-linked glycan of the antibody) retained significant antitumor activity. Given the fact that RLI treatment alone had no significant effect, they indicate that the enhanced bioavailability of RLI as a result of its fusion to an antibody plays a significant role. Indeed, the serum half-life and AUC of RLI were increased by about 3-fold and 34-fold, respectively, when fused to RTX and similar results were previously found with anti-GD2-RLI.³⁷ Nonetheless, given the much higher efficiency of anti-CD20-RLI over anti-GD2-RLI in the Raji model, the anti-CD20 component of the ICK has an essential role, targeting the RLI to the tumor site where antibody cytotoxic functions and cytokine-immunostimulatory functions can cooperate. ADCC triggered by human Fc in mouse model has already been evidenced in vivo, using RTX and FCR γ chain-deficient mice⁴³ or NK cell-depleted mice.¹⁰ The higher in vitro activities of anti-CD20-RLI compared to RLI (7-fold higher proliferative response through IL-15R β/γ) or anti-CD20 (higher CDC and NK cells activation) likely participate to this increased in vivo antitumor effect.

As expected, the fusion of RLI to the carboxy-terminus of RTX shortened its circulating half-life (8.5 h vs 100 h), an effect usually observed with immunocytokines^{44,45} and depending to some extent on uptake by FCR-bearing cells as well as intracellular proteolysis. In contrast to ch14.18-IL-2 (an anti-GD2-IL-2 fusion protein),⁴⁶ proteolytic cleavage of anti-CD20-RLI seems unlikely since similar plasma levels were detected using two ELISA methods that distinguish between the Ab moiety and the intact fusion protein. Given the similar binding of anti-CD20-RLI and RTX to Fc γ RIIIa, a modification of the

recycling through the binding to FcRn could explain the shorter half-life of the ICK, but it remains to be evaluated.

All these results demonstrate the interest of targeting RLI to the tumor site. Furthermore, given the facts that human IgGs will at least bind human FcRγs as efficiently as mouse FcRγs⁴⁷ and that human IL-15 is more active on human than mouse NK cells,⁴⁸ an even higher effect of the RLI-based ICK may be expected in human. The interest of targeting RLI to the tumor site by the means of an anti-CD20 antibody has not been reported so far. Our study highlights its therapeutic benefits, which are related to the improved pharmacokinetic properties of the cytokine provided by the antibody, together with the preservation and even increased effector properties of the latter (ADCC, CDC, NK cells activation). This synergistic combination should allow a reduction of the therapeutic doses, limit the side effects of both components and improve the clinical efficacy of RTX, particularly in patients with refractory B-cell lymphoma. The better safety profile of IL-15 compared to IL-2 allows considering such fusion proteins as promising drugs in cancer immunotherapy.

RTX resistance in the treatment of B-cell NHL is a common clinical occurrence present in about half of treatment-naïve patients and developing with repeated treatment in the remainder. However, its exact mechanisms remain poorly understood, although potential implication of the three major pathways of RTX action (complement fixation, ADCC, and apoptosis induction) has been proposed.⁴⁹ Whereas recognition of antigen-bound RTX by Fc-receptor bearing monocytes appears to lead to CD20-antibody complex shaving (leading to RTX resistance), its recognition by NK cells leads to ADCC (leading to RTX efficacy).⁵⁰ Thus, anti-CD20-RLI, by inducing NK cells recruitment and activation at the tumor site through its cytokine moiety, would favor ADCC over shaving. Anti-CD20-RLI would hence be expected to be particularly suitable for patients whose resistance to RTX treatment is known to be related to an ADCC default. However, the SCID CB-17/Raji mouse model used

346 in this report expresses NK cells and myeloid cells but is devoid of the T/B compartments.
347 Further preclinical studies must therefore be performed to take into account the role of the
348 adaptive immune response component and to determine the preclinical toxicity.

349

350

351

Materials and Methods

352

353 *Reagents and animals:*

354 Seven-week-old male C57BL/6 mice and five-week-old female SCID CB-17 mice were
355 obtained from Janvier (France) and Charles River (France), respectively. Mice were
356 maintained under pathogen-free conditions and experiments were carried out in accordance
357 with French laws and regulations. Recombinant human IL-15 was obtained from Peprotech,
358 Inc. (Rocky Hill, NJ) and recombinant human IL-2 from Chiron (Suresnes, France).
359 Recombinant human IL-15R β (224-2B/CF), recombinant human common γ chain (384-
360 RG/CF), murine IL-3, mouse anti-human IL-15 mAb (MAB247) and its biotinylated form
361 (BAM247) were purchased from R&D Systems (Lille, France). RLI was produced as
362 described previously.³³ Control human isotype IgG was purchased from Santa-Cruz
363 Biotechnology (Heidelberg, Germany), peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-human
364 IgG (H+L) (109-036-003) from Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK), anti-human IgG
365 (H+L) (UP892370) from Interchim (Montluçon, France), mouse anti-human IL-15 mAb (B-
366 E29) from Gen-Probe (Manchester, UK) and RTX, an anti-CD20 mAb from Roche
367 (Boulogne-Billacourt, France). FITC-conjugated 3G8 mAb specific for CD16, phycoerythrin-
368 conjugated NKH-1 mAbs specific for CD56, phycoerythrin-labeled anti-human anti-CD19
369 (A07769), FITC-labeled anti-human anti-CD3/phycoerythrin-cyanin5-labeled anti-human
370 anti-CD56 (A07415) were purchased from Beckman Coulter (Villepinte, France) and are
371 mouse IgG1. ScreenSureFire STAT5 (p-Tyr694/699) Assays Kit (TGRS5S500) was from
372 PerkinElmer (Courtaboeuf, France).

373

374 *Cell Culture:*

All cell lines were grown at 37°C under a humidified 5% CO₂ atmosphere. Kit225 T lymphoma human cells,⁵¹ 32D β lymphoblast murine cells⁵² and CD16-transduced NK-92 cells, used to evaluate the binding to CD16, were grown as described previously.³⁷ The human Raji cell line (ATCC CCL-86) and the human Daudi cell line (ATCC CCL-213) were cultured in RPMI-1640 medium with 10% fetal calf serum (FCS) and 2mM glutamine. NK cells, used as effector cells in ADCC experiment, were prepared from peripheral blood mononuclear cells of healthy donor of Etablissement Français du Sang of Nantes with the human NK EasySepKit (Stemcell Technologies). All human cell lines were authenticated less than 6 months before the end of the experiments by using Promega Power Plex 18 System for DNA testing (DDC, London, UK).

ICKs plasmids construction:

The light chain and the heavy chain sequences of RTX were cloned in pcDNA6 and pcDNA3.1 Hygro, respectively (Life Technologies Ltd, UK). The IL-15 superagonist RLI³³ was fused in frame at the 3' end of the RTX heavy chain. An irrelevant ICK (anti-GD2-RLI) was also constructed with the heavy and light chains of the anti-GD2 antibody as templates.³⁷

ICKs expression and purification:

Expression plasmids pcDNA6 blasticidine/anti-CD20-L and pcDNA3.1 HYGRO/anti-CD20-H-RLI were transiently transfected into CHO cells using Polyethyleneimine (Tebu-bio) according to the manufacturer's instructions. ICK production was further conducted in Power CHO-2-CD medium (Lonza). ICK were affinity-purified from culture supernatants by using a HiTrap Protein A HP column (GE Healthcare). The eluted ICK were dialyzed against PBS for buffer exchange, sterile-filtered (0.22 μ m), and stored at -80°C. ICK concentrations were determined by measuring the absorbance at 280nm and their purities

were analyzed in NR and R conditions on SDS-PAGE, in R conditions on Western blot and in native conditions by Akta purifier 10 gel filtration on a Superdex S-200 size exclusion column (GE Healthcare).

SDS-PAGE and Western blot analysis:

Purified proteins were analyzed on 4-12% Bis-Tris Gels (Life Technologies), as described previously.³⁷ For Western blot analysis of purified proteins, an anti-human IgG (Interchim UP892370) or an anti-IL-15 mAb (B-E29) were used as primary antibody before a secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-goat/anti-rabbit or anti-mouse antibody conjugated with HRP.

ELISAs:

Anti-CD20-RLI plasma levels were evaluated with two ELISAs. The first ELISA used an anti-human IgG (UP892370) as capture antibody and the biotinylated anti-IL-15 (BAM247) also recognizing the IL-15 moiety in RLI, as revealing antibody. The second used the same capture antibody as above and an anti-IgG antibody (109-036-003) as revealing antibody, and was also used to measure RTX plasma levels.

Binding Properties of ICKs:

For CD20 or IL-15 receptor binding, Raji, Kit225 or 32D β (2×10^5) were incubated 1h at 4°C with either 10 μ g/ml anti-CD20-RLI, RTX or control isotype IgG. After reaction with 1.25 μ g/ml PE-labeled goat anti-human IgG as a secondary antibody (BD Biosciences), cell fluorescence was measured in a Calibur flow cytometer and data were analyzed using FlowJo Software (BD Biosciences).

The binding to FcγRIIIa expressed at the surface of CD16-transduced NK-92 cells was performed as described previously.⁵³ In brief, cells (10^5) were incubated with indicated concentrations of RTX, RLI, anti-CD20-RLI or the association of RTX and RLI for 30 min at 4°C followed by FITC-conjugated anti-CD16 3G8 mAb and analyzed by flow cytometry. Fluorescence analyses were performed using Kaluza 1.2 version (Beckman Coulter). Results were expressed as the percentage of inhibition of 3G8 mAb binding: $(\text{MFI in absence of rituximab} - \text{MFI in presence of rituximab}) \times 100 / (\text{MFI in absence of rituximab})$.⁵³

The binding to IL-15Rβ/γ was further evaluated by SPR studies. The SPR experiments were performed at 25°C with a BIAcore 3000 biosensor (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). Recombinant IL-15Rβ and Rγ were covalently linked to CM5 sensor chips using the amine coupling method in accordance with the manufacturer's instructions, and the binding of increasing concentrations of RLI or anti-CD20-RLI was monitored as described.³³ The BIAeval 4.1 software was used to fit data.

Proliferation Assays:

The proliferative responses of Kit225 and 32Dβ cells to IL-15, RLI or anti-CD20-RLI was assessed by Alamar blue reduction assay (AbDSerotec). Cells were starved in the culture medium without cytokine during 24h for Kit225 or 4h for 32Dβ. They were plated at 1×10^4 cells in 100μl and cultured for 48h in the medium supplemented with increasing concentrations of IL-15, RLI or anti-CD20-RLI. The effect of RTX (100nM) alone or added to increasing concentrations of anti-CD20-RLI was also evaluated. Alamar blue (10μl) was added to each well and the fluorescence was measured at excitation 560nm and emission 590nm using Fluoroskan Ascent FL reader (Thermo Electro Corporation) after a 6h-incubation period at 37°C.

449 *Phospho-STAT5 Assays:*

450 Detection of phospho-STAT5 (p-STAT5) proteins was assessed by AlphaScreenSureFire
451 STAT5 assay kit (PerkinElmer). Exponentially-growing 32D β cells were washed and serum-
452 starved to reduce basal phosphorylation (4h in cytokine-deprived RPMI-1640 medium
453 supplemented with 0.5% FCS and 2mM glutamine). After 30min stimulation with increasing
454 concentrations of IL-15, RLI or anti-CD20-RLI at 37°C, cells were suspended in ice-cold
455 PBS and cell pellets were lysed by the addition of 50 μ l of Lysis buffer with shaking for
456 15min. A portion of lysate from each condition (4 μ l) was transferred to a 384-well ProxiPlate
457 and assayed for p-STAT5. Briefly, a mixture of Reaction buffer, Activation buffer, and
458 AlphaScreen Acceptor beads was prepared under low light conditions according to the
459 manufacturer's instructions, and 5 μ l of the assay mixture was added to lysates in each well.
460 The plates were sealed and covered in foil, and incubated at room temperature for 2h. After
461 this, a mixture of Dilution buffer and AlphaScreen donor beads was prepared under low light
462 conditions, and 2 μ l was added to the wells. The plates were sealed and covered in foil, and
463 incubated at room temperature for 2h. The signal in the wells was then detected using an
464 EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer). Lysates protein concentration was
465 determined by BC Assay Kit (Uptima) using BSA as standard.

466

467 *ADCC and CDC Assays:*

468 Lysis of Raji and Daudi cells was evaluated using ^{51}Cr release assays. Target cells (1×10^6
469 cells) were incubated at 37°C with 75 μCi ^{51}Cr ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, Perkin-Elmer) during 1h and
470 washed by centrifugation. CDC and ADCC assays were performed as previously described.³⁷
471 NK cells were prepared from donor CD16^{VV} genotype.

472

473 *B cells depletion Assay:*

Heparinized blood samples (100 μ L/well) from healthy human donors were incubated 4h at 37°C with indicated concentrations of either anti-CD20-RLI, RTX, RLI or the association of RLI and RTX. After a 15min-incubation at room temperature with PE-labeled anti-human anti-CD19, FITC-labeled anti-human anti-CD3 and PE-Cy5-labeled anti-human anti-CD56, cells were analyzed by flow cytometry.

NK-cell activation:

For the study of functional responses of NK cells, culture plates were sensitized overnight at 4°C with a saturating concentration of RTX or anti-CD20-RLI (10 μ M) as described.⁵⁴ Isolated NK cells (10⁵), were laid down in anti-CD20-RLI-sensitized culture plates or in RTX-sensitized culture plates in the absence or in the presence of RLI (10 μ M) or in unsensitized culture plates in the presence of a combination of PMA and CaI used as positive control (100 ng/mL and 500ng/mL respectively). NK cells were incubated for 1, 2 or 3h at 37°C with PC5-conjugated anti-CD107a, and then labeled with PC7-conjugated 3G8 (30 min, 4°C) and analyzed by flow cytometry as described.⁵⁴

Pharmacokinetic experiments:

C57BL/6 mice were injected i.p. with molar equivalent dose of anti-CD20-RLI (16 μ g) or RTX (12 μ g). At various time points (up to 312h), blood samples were taken (3 mice per point) and immediately centrifuged, and the plasma was frozen at -20°C. Proteins plasma levels were evaluated using two ELISAs (see above) and biodisponibility parameters were calculated using a one-compartment model with GraphPad Prism software.

Tumor model:

The procedure (number CEEA-Pdl.2011.36) was approved by French Ethics Committee for animal experimentation number 6. Human lymphoma Raji cells (2.5×10^6) were injected intravenously (i.v.) in SCID mice.⁵⁵ Mice (10 mice per group) were then injected i.p. at days 5, 10, 15 and 20 after cells transplantation, with saline or equimolar doses of RLI (2 μ g), RTX (12 μ g), co-administration of RTX and RLI, anti-CD20-RLI (16 μ g) or anti-GD2-RLI (16 μ g) as irrelevant ICK. A higher dose of RTX (200 μ g) was also tested. Paralysis of mice was considered as the limit point for survival curves.

Statistical analysis:

The data are presented as mean $\pm$ SEM. The animal survival data were analyzed using Kaplan and Meier survival analysis. Statistical analysis used log-rank test for survival curves and F-test for pharmacokinetic experiments. P values of less than 0.05 were considered significant.

511

512

Acknowledgements

513 M.V. was supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
514 Recherche and the Association pour la Recherche sur le Cancer. The authors thank Karine
515 Bernardeau and Klara Echasserieu (Recombinant Protein Facility) for site-exclusion
516 chromatography analysis and Virginie Maurier for technical assistance.

517

518

519 **Financial support:** INSERM, CNRS, Institut National du Cancer and Cancéropole Grand
520 Ouest (MabImpact), OSEO Innovation and Région Pays de Loire (CIMATH2), Ministère de
521 l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Association pour la Recherche sur le Cancer
522 and Ligue contre le Cancer.

523

524 **Conflict-of-interest disclosure:** AQ, DB and YJ are co-founders and shareholders of Cytune
525 Pharma. The remaining authors declare no competing financial interests.

526

527

References

528

- 529 1. Molina A. A decade of rituximab: improving survival outcomes in non-Hodgkin's lymphoma.
530 *Annu Rev Med* 2008; 59:237-250.
- 531 2. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G,
532 Hess G, von Grünhagen U, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in
533 patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*
534 2010; 376:1164-1174.
- 535 3. Ruuls SR, Lammerts van Bueren JJ, van de Winkel JGJ, Parren PWHI. Novel human antibody
536 therapeutics: the age of the Umabs. *Biotechnol J* 2008; 3:1157-1171.
- 537 4. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve
538 rituximab efficacy. *Blood* 2004; 104:2635-2642.
- 539 5. Boross P, Leusen JHW. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res* 2012;
540 2:676-690.
- 541 6. Davis TA, Grillo-López AJ, White CA, McLaughlin P, Czuczman MS, Link BK, Maloney DG,
542 Weaver RL, Rosenberg J, Levy R. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-
543 Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol* 2000; 18:3135-3143.
- 544 7. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance.
545 *Oncogene* 2003; 22:7359-7368.
- 546 8. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K,
547 Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, et al. The absence of fucose but not the presence of
548 galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides
549 shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 2003;
550 278:3466-3473.
- 551 9. Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability
552 to recruit complement and mediate effector functions. *mAbs* 2010; 2:181-189.
- 553 10. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Jupudy V, Ostberg J, Oflazoglu E, Huberman A, Repasky E,
554 Czuczman MS. Neutrophils contribute to the biological antitumor activity of rituximab in a non-
555 Hodgkin's lymphoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Clin Cancer Res* 2003;
556 9:5866-5873.
- 557 11. Gluck WL, Hurst D, Yuen A, Levine AM, Dayton MA, Gockerman JP, Lucas J, Denis-Mize K,
558 Tong B, Navis D, et al. Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-
559 hodgkin's lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical
560 response. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2253-2264.
- 561 12. Eisenbeis CF, Grainger A, Fischer B, Baiocchi RA, Carrodegua L, Roychowdhury S, Chen L,
562 Banks AL, Davis T, Young D, et al. Combination immunotherapy of B-cell non-Hodgkin's
563 lymphoma with rituximab and interleukin-2: a preclinical and phase I study. *Clin Cancer Res*
564 2004; 10:6101-6110.

- 565 13. Gillies SD, Lan Y, Williams S, Carr F, Forman S, Raubitschek A, Lo K-M. An anti-CD20-IL-2
566 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B
567 lymphoma. *Blood* 2005; 105:3972-3978.
- 568 14. Kontermann RE. Antibody-cytokine fusion proteins. *Arch Biochem Biophys* 2012;
569 526:194-205.
- 570 15. Pasche N, Neri D. Immunocytokines: a novel class of potent armed antibodies. *Drug Discov*
571 *Today* 2012; 17:583-590.
- 572 16. Munger W, DeJoy SQ, Jeyaseelan R Sr, Torley LW, Grabstein KH, Eisenmann J, Paxton R, Cox
573 T, Wick MM, Kerwar SS. Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-
574 15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2. *Cell Immunol* 1995;
575 165:289-293.
- 576 17. Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M, Bertles J, Tometsko M, Loomis A, Giri J, Copeland NG,
577 Gilbert DJ, Jenkins NA. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha
578 chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem* 1995; 270:29862-29869.
- 579 18. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, DuBose R, Cosman D, Park
580 LS, Anderson DM. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally
581 related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* 1995; 14:3654-3663.
- 582 19. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In
583 trans to neighboring cells. *Immunity* 2002; 17:537-547.
- 584 20. Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Coordinate expression and trans
585 presentation of interleukin (IL)-15Ralpha and IL-15 supports natural killer cell and memory
586 CD8+ T cell homeostasis. *J Exp Med* 2004; 200:825-834.
- 587 21. Mortier E, Advincula R, Kim L, Chmura S, Barrera J, Reizis B, Malynn BA, Ma A.
588 Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of
589 distinct CD8+ T cell subsets. *Immunity* 2009; 31:811-822.
- 590 22. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K,
591 Sedger L, Willis CR, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages
592 in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 2000; 191:771-780.
- 593 23. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy
594 and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:595-601.
- 595 24. Marks-Konczalik J, Dubois S, Losi JM, Sabzevari H, Yamada N, Feigenbaum L, Waldmann TA,
596 Tagaya Y. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc*
597 *Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:11445-11450.
- 598 25. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c)
599 family cytokines. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:480-490.
- 600 26. Moga E, Alvarez E, Cantó E, Vidal S, Rodríguez-Sánchez JL, Sierra J, Briones J. NK cells
601 stimulated with IL-15 or CpG ODN enhance rituximab-dependent cellular cytotoxicity against
602 B-cell lymphoma. *Exp Hematol* 2008; 36:69-77.

- 603 27. Moga E, Cantó E, Vidal S, Juarez C, Sierra J, Briones J. Interleukin-15 enhances rituximab-
604 dependent cytotoxicity against chronic lymphocytic leukemia cells and overcomes transforming
605 growth factor beta-mediated immunosuppression. *Exp Hematol* 2011; 39:1064-1071.
- 606 28. Laprevotte E, Voisin G, Ysebaert L, Klein C, Daugrois C, Laurent G, Fournie J-J, Quillet-Mary
607 A. Recombinant Human IL-15 Trans-Presentation by B Leukemic Cells from Chronic
608 Lymphocytic Leukemia Induces Autologous NK Cell Proliferation Leading to Improved Anti-
609 CD20 Immunotherapy. *J Immunol* 2013; 191:3634-3640
- 610 29. Mortier E, Bernard J, Plet A, Jacques Y. Natural, proteolytic release of a soluble form of human
611 IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J Immunol*
612 2004; 173:1681-1688.
- 613 30. Dubois S, Patel HJ, Zhang M, Waldmann TA, Müller JR. Preassociation of IL-15 with IL-15R
614 alpha-IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8+/CD44high T cells and its
615 antitumor action. *J Immunol* 2008; 180:2099-2106.
- 616 31. Epardaud M, Elpek KG, Rubinstein MP, Yonekura A, Bellemare-Pelletier A, Bronson R,
617 Hamerman JA, Goldrath AW, Turley SJ. Interleukin-15/interleukin-15R alpha complexes
618 promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8+ T cells. *Cancer Res*
619 2008; 68:2972-2983.
- 620 32. Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrançois L. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy
621 maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol* 2006; 177:6072-6080.
- 622 33. Mortier E, Quémener A, Vusio P, Lorenzen I, Boublik Y, Grötzinger J, Plet A, Jacques Y.
623 Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of
624 IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. *J*
625 *Biol Chem* 2006; 281:1612-1619.
- 626 34. Bouchaud G, Garrigue-Antar L, Solé V, Quémener A, Boublik Y, Mortier E, Perdreau H,
627 Jacques Y, Plet A. The exon-3-encoded domain of IL-15Ralpha contributes to IL-15 high-affinity
628 binding and is crucial for the IL-15 antagonistic effect of soluble IL-15Ralpha. *J Mol Biol* 2008;
629 382:1-12.
- 630 35. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, Corcuff E, Mortier E, Jacques
631 Y, Spits H, et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and
632 differentiation in vivo. *J Exp Med* 2009; 206:25-34.
- 633 36. Bessard A, Solé V, Bouchaud G, Quémener A, Jacques Y. High antitumor activity of RLI, an
634 interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and
635 colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 2009; 8:2736-2745.
- 636 37. Vincent M, Bessard A, Cochonneau D, Teppaz G, Solé V, Maillason M, Birklé S, Garrigue-
637 Antar L, Quémener A, Jacques Y. Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-
638 GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency. *Int J Cancer* 2013; 133:757-765.
- 639 38. Clémenceau B, Vivien R, Pellat C, Foss M, Thibault G, Vié H. The human natural killer
640 cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient
641 cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential. *mAbs* 2013;
642 5:587-594.

- 643 39. Perdreau H, Mortier E, Bouchaud G, Solé V, Boublik Y, Plet A, Jacques Y. Different dynamics
644 of IL-15R activation following IL-15 cis- or trans-presentation. *Eur Cytokine Netw* 2010;
645 21:297-307.
- 646 40. Blasco H, Lalmanach G, Godat E, Maurel MC, Canepa S, Belghazi M, Paintaud G, Degenne D,
647 Chatelut E, Cartron G, et al. Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in
648 serum. *J Immunol Methods* 2007; 325:127-139.
- 649 41. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic
650 lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2003; 63:803-843.
- 651 42. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR,
652 Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal
653 antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose
654 treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16:2825-2833.
- 655 43. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo
656 cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6:443-446.
- 657 44. Gillies SD, Lan Y, Lo KM, Super M, Wesolowski J. Improving the efficacy of antibody-
658 interleukin 2 fusion proteins by reducing their interaction with Fc receptors. *Cancer Res* 1999;
659 59:2159-2166.
- 660 45. Gillies SD, Lo K-M, Burger C, Lan Y, Dahl T, Wong W-K. Improved circulating half-life and
661 efficacy of an antibody-interleukin 2 immunocytokine based on reduced intracellular proteolysis.
662 *Clin Cancer Res* 2002; 8:210-216.
- 663 46. Kendra K, Gan J, Ricci M, Surfus J, Shaker A, Super M, Frost JD, Rakhmilevich A, Hank JA,
664 Gillies SD, et al. Pharmacokinetics and stability of the ch14.18-interleukin-2 fusion protein in
665 mice. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48:219-229.
- 666 47. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease
667 models. *Blood* 2012; 119:5640-5649.
- 668 48. Eisenman J, Ahdieh M, Beers C, Brasel K, Kennedy MK, Le T, Bonnert TP, Paxton RJ, Park
669 LS. Interleukin-15 interactions with interleukin-15 receptor complexes: characterization and
670 species specificity. *Cytokine* 2002; 20:121-129.
- 671 49. Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011;
672 24:203-216.
- 673 50. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA, Taylor RP. The shaving reaction:
674 rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic
675 leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol* 2006; 176:2600-2609.
- 676 51. Hori T, Uchiyama T, Tsudo M, Umadome H, Ohno H, Fukuhara S, Kita K, Uchino H.
677 Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic
678 lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell leukemia/lymphoma virus. *Blood*
679 1987; 70:1069-1072.
- 680 52. Nakamura Y, Russell SM, Mess SA, Friedmann M, Erdos M, Francois C, Jacques Y, Adelstein
681 S, Leonard WJ. Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic
682 domains is required for signalling. *Nature* 1994; 369:330-333.

- 683 53. Dall'Ozzo S, Tartas S, Piantaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G.
684 Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism
685 on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 2004; 64:4664-4669.
- 686 54. Congy-Jolivet N, Bolzec A, Ternant D, Ohresser M, Watier H, Thibault G. Fc gamma RIIIa
687 expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma RIIIa-158V allotype.
688 *Cancer Res* 2008; 68:976-980.
- 689 55. Wu L, Wang C, Zhang D, Zhang X, Qian W, Zhao L, Wang H, Li B, Guo Y. Characterization of
690 a humanized anti-CD20 antibody with potent antitumor activity against B-cell lymphoma.
691 *Cancer Lett* 2010; 292:208-214.

692

693

Figure legends

Figure 1: *A RLI-based immunocytokine targeting the CD20 antigen and its potential mechanisms of action.* RLI was fused to the C-terminus of the anti-CD20 antibody (RTX) heavy chain. The use of such fusion protein presents the advantages to trigger at the tumor site (B cell malignancies) the cytotoxic effector functions of the anti-CD20 antibody moiety together with the cytokine co-signal required for the generation of cytotoxic cellular immunity while avoiding the toxicities associated with systemic cytokine delivery.

Figure 2: *Production and purification of the anti-CD20-RLI ICK.* (A), ICK construction, PL: Peptidic Linker within RLI fusion protein.³³ (B), SDS-PAGE under non reducing (*left panel*) and reducing (*middle panel*) conditions (*Lane 1: 5 μ g of RTX, line 2: 5 μ g of anti-CD20-RLI*); Western blot analysis using anti-IgG Ab (*right panel, line 1: 0.1 μ g of anti-CD20-RLI*) or anti-IL-15 Ab (*right panel, line 2: 0.1 μ g of anti-CD20-RLI*). kDa: kilo Dalton; Mw: Molecular weight. (C), gel-filtration analysis of RTX (*left panel*) or affinity-purified anti-CD20-RLI (*right panel*) revealing mainly monomer.

Figure 3: *Characterization of the anti-CD20-RLI ICK.* (A), Specific binding of anti-CD20-RLI and RTX antibodies revealed by flow cytometry: Raji (*left panel*), Kit225 (*middle panel*) and 32D β (*right panel*) cells. Control Ab (filled pink); RTX (green line), anti-CD20-RLI (orange line) and anti-GD2-RLI (blue line). (B) Binding of RTX and anti-CD20-RLI to human CD16-transduced NK-92 cells. CD16-transduced NK-92 cells were incubated with varying concentrations of RTX (○), RLI (■), anti-CD20-RLI (□) or the association of RTX and RLI (●) for 30 min at 4°C followed by FITC-conjugated anti-CD16 3G8 mAb and then

analyzed by flow cytometry. Percentages of inhibition of 3G8 binding were calculated as described in “Methods”. (C) Binding affinities of RLI and anti-CD20-RLI for IL-15R β / γ . SPR sensorgrams of binding to immobilized soluble IL-15R β / γ with increasing concentrations (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200nM) of RLI (left panel) or anti-CD20-RLI (right panel).

Figure 4: *Cytokine-dependent functional effects of anti-CD20-RLI.* (A) Kit225 or (B) 32D β cell proliferation induced by increasing concentrations of human IL-15 ($\blacktriangle$), RLI ($\blacksquare$) or anti-CD20-RLI ($\square$) was assessed by Alamar blue reduction assay. (C) Phosphorylation of STAT5 was evaluated in 32D β cells stimulated during 30min by increasing concentrations of human IL-15 ($\blacktriangle$), RLI ($\blacksquare$) or anti-CD20-RLI ($\square$). Data are means $\pm$ SEM of three experiments.

Figure 5: *CDC and ADCC activities of anti-CD20-RLI.* (A) For CDC, CD20 positive Daudi cells were incubated with increasing concentrations of RTX ($\circ$), anti-CD20-RLI ($\square$) and anti-GD2 ($\blacktriangle$) as a negative control, in the presence of human serum as a source of complement. Lysis of Daudi cells was evaluated using ^{31}Cr release assays. (B) ADCC was evaluated on Raji cells at an E/T ratio of 10:1, in the presence of increasing concentrations of RLI ($\blacksquare$), RTX ($\circ$), RTX + RLI ($\bullet$), anti-GD2 ($\blacktriangle$) and anti-CD20-RLI ($\square$) and using human purified NK cells from healthy donors. Data are means $\pm$ SEM of three experiments.

Figure 6: *CD19 $^{+}$ cells depletion induced by anti-CD20-RLI.* Human whole blood from healthy donors was incubated with RLI ($\blacksquare$), RTX ($\circ$), RTX + RLI ($\bullet$) and anti-CD20-RLI ($\square$) and CD19 $^{+}$ cells depletion was evaluated by flow cytometry. Data are means $\pm$ SEM of three experiments.

Figure 7: *Effect of anti-CD20-RLI on NK-cell activation.* CD16A down modulation (**A**) and CD107 expression (**B**) induced by RLI, RTX, RTX + RLI and anti-CD20-RLI (10 μ M) were evaluated in human isolated NK cells after 1h (○), 2h (▲) or 3h (■) incubation time. A combination of PMA and Calcium Ionophore was used as positive control. Data are means $\pm$ SEM of three experiments.

Figure 8: *Pharmacokinetic profiles of anti-CD20-RLI.* Male C57BL/6 mice were injected with a single i.p. of 16 μ g anti-CD20-RLI (□) or 12 μ g of RTX (○) and plasma concentrations were determined by ELISA at the indicated points. *, $P < 0.0001$ vs anti-CD20-RLI, F test.

Figure 9: *Effect of anti-CD20-RLI on survival of tumor-bearing SCID mice.* Mice were inoculated intravenously with Raji cells (2.5×10^6). At days 5, 10, 15 and 20 after tumor inoculation, groups of 10 mice were treated with (**A**) saline (open triangle), low dose (12 μ g, open circle) or conventional therapeutic dose (200 μ g, filled gray circle) of RTX or (**B**) with equimolar dose of saline, RLI (2 μ g), RTX (12 μ g), RTX + RLI, anti-CD20-RLI (16 μ g) or anti-GD2-RLI (16 μ g). Mice were monitored daily and sacrificed at the onset of hind leg paralysis. Percent survival of mice after treatment with saline (▽), RLI (■), RTX (○), RTX + RLI (●), anti-CD20-RLI (□) or anti-GD2-RLI (◇). *, $P < 0.001$ vs saline, RLI, RTX, RTX + RLI and anti-GD2-RLI; #, $P < 0.01$ vs, saline, RLI, RTX and RTX + RLI; £, $P < 0.01$ vs saline, RLI and RTX; \$, $P < 0.05$ vs saline and RLI, Log-rank test.

765

766 **Table 1:** Summary of the pharmacokinetic parameters of IL-15, RLI, anti-CD20-RLI and RTX
 767 in male C57BL/6 mice following a single i.p. administration of a cytokine equivalent molar
 768 dose (160pmol).

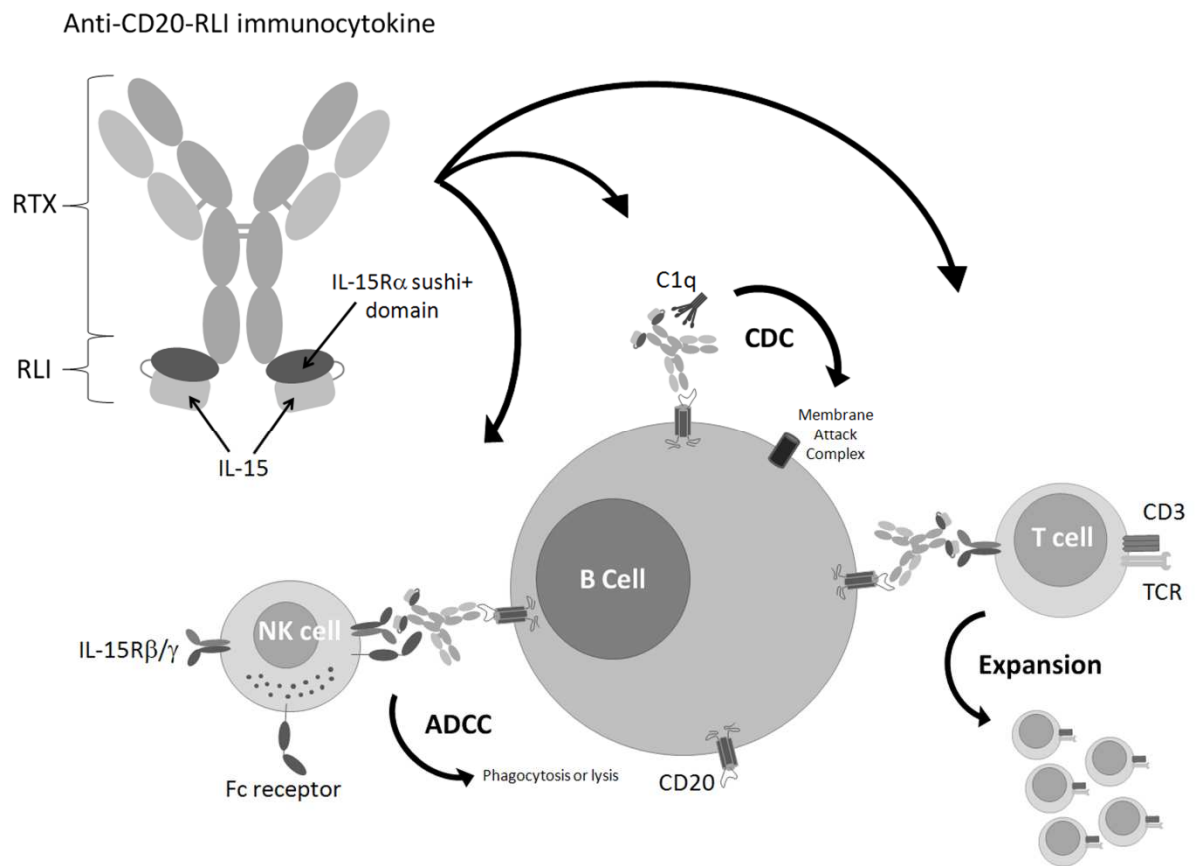
769

	RTX	Anti-CD20-RLI	RLI*	IL-15*
Mw (kDa)	150	200	25	13
Dose (µg)	12	16	4	2.4
Dose (pmol)	80	80	160	160
C _{max} (nM)	43.2	50.8	3.4	4.7
T _{max} (h)	6	6	1	0.5
T _{1/2} (h)	100	8.5	3	0.5
AUC (nM.h)	7770	1188	35	5

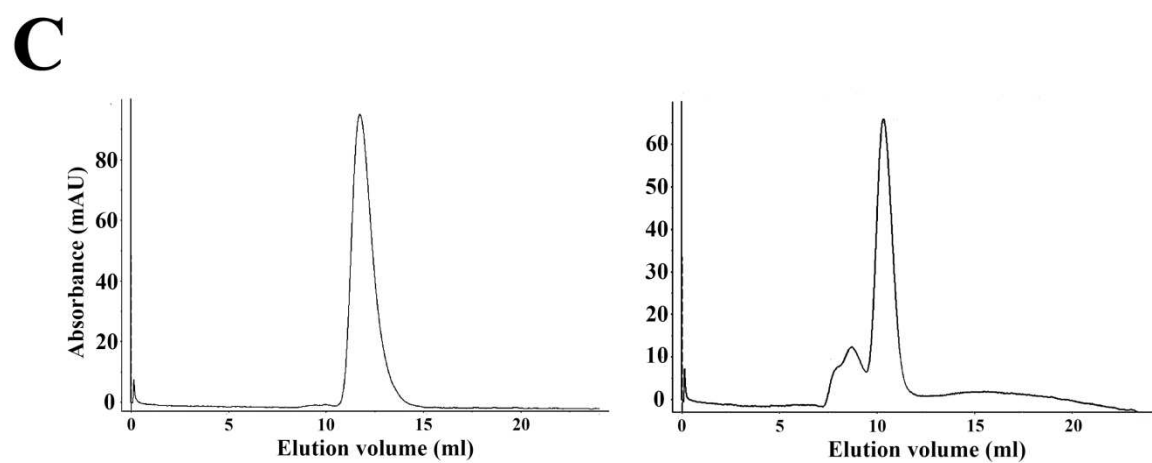
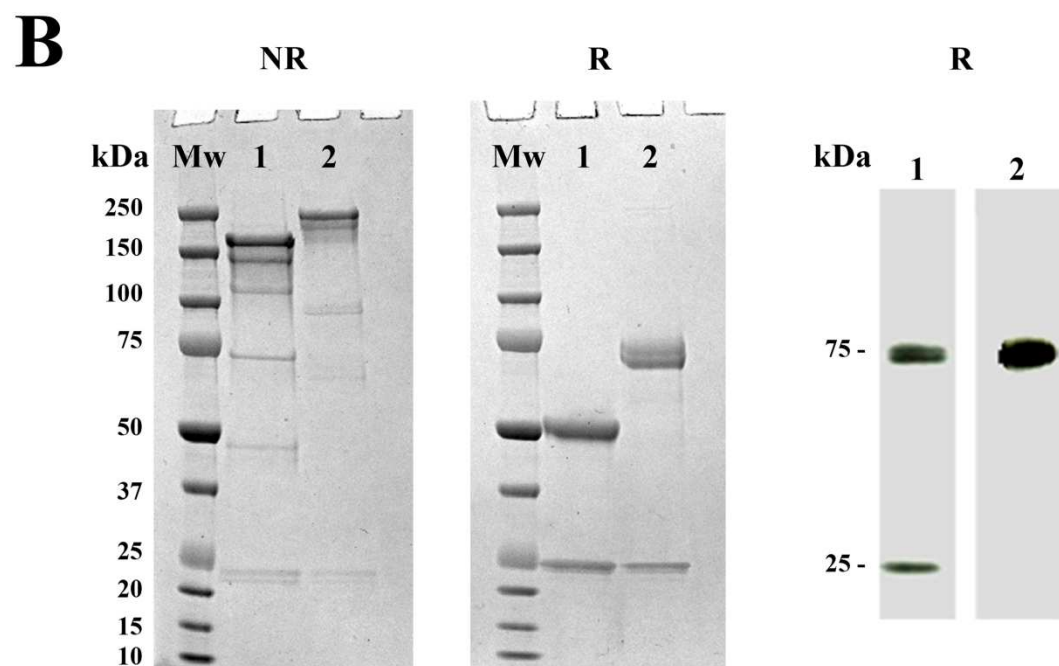
Mw : molecular weight; C_{max} : maximum plasma concentration; T_{max} : time to reach maximum plasma concentration; T_{1/2} : half-life; AUC : area under the curve

* Values taken from Bessard et al.³⁶

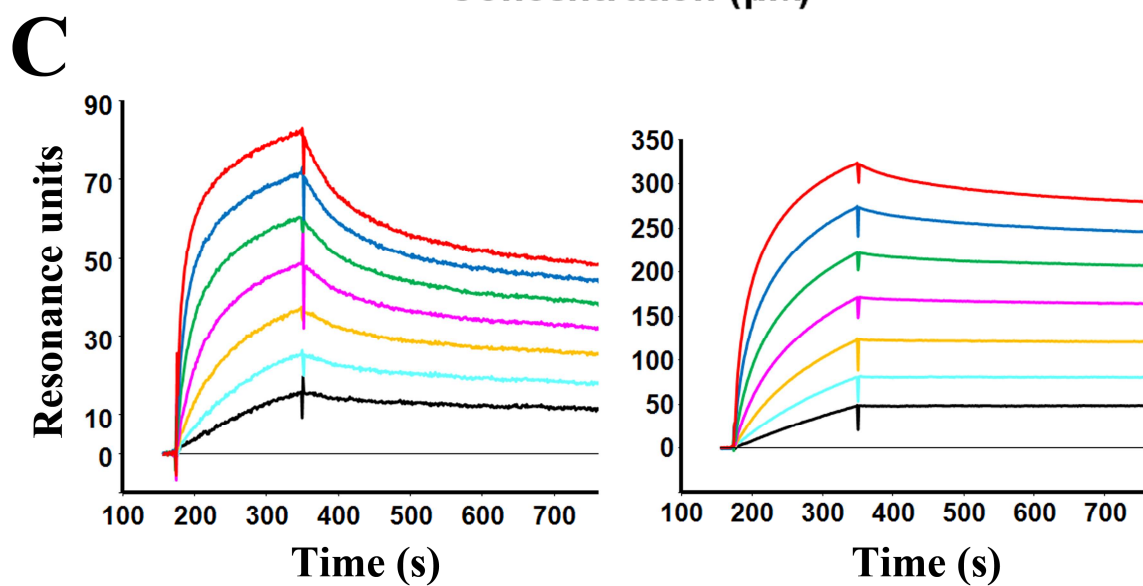
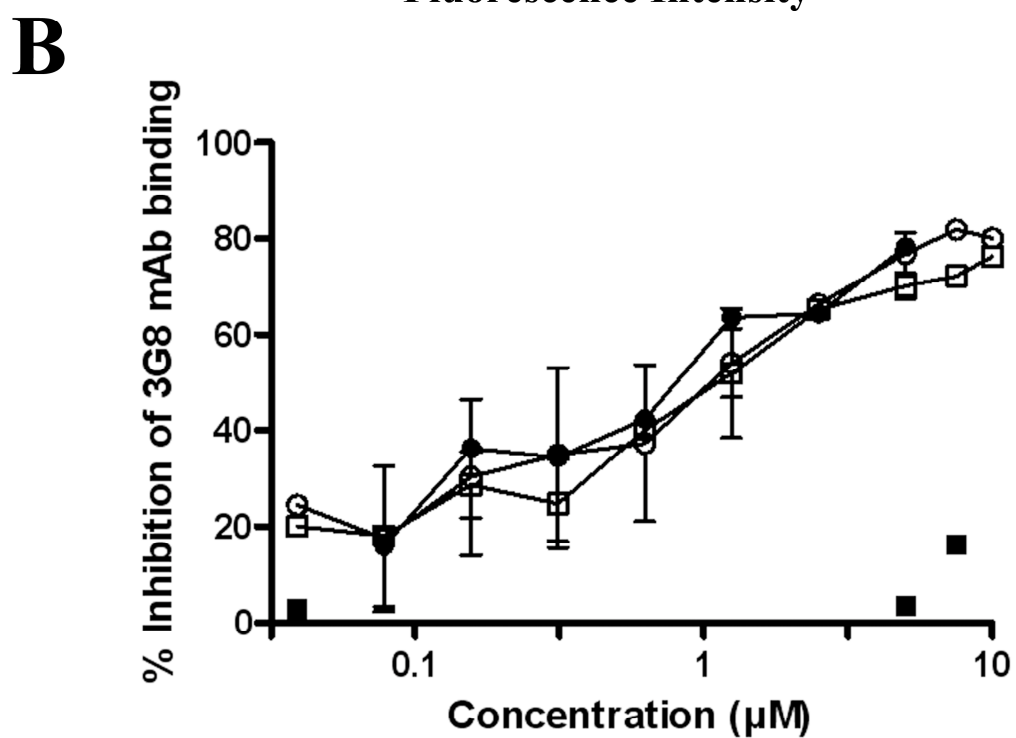
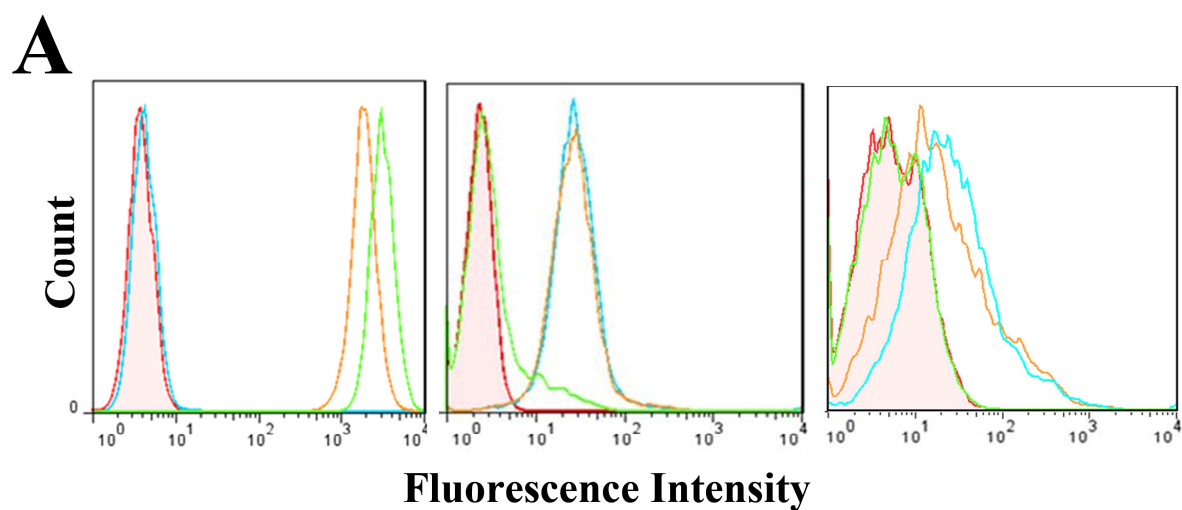
770

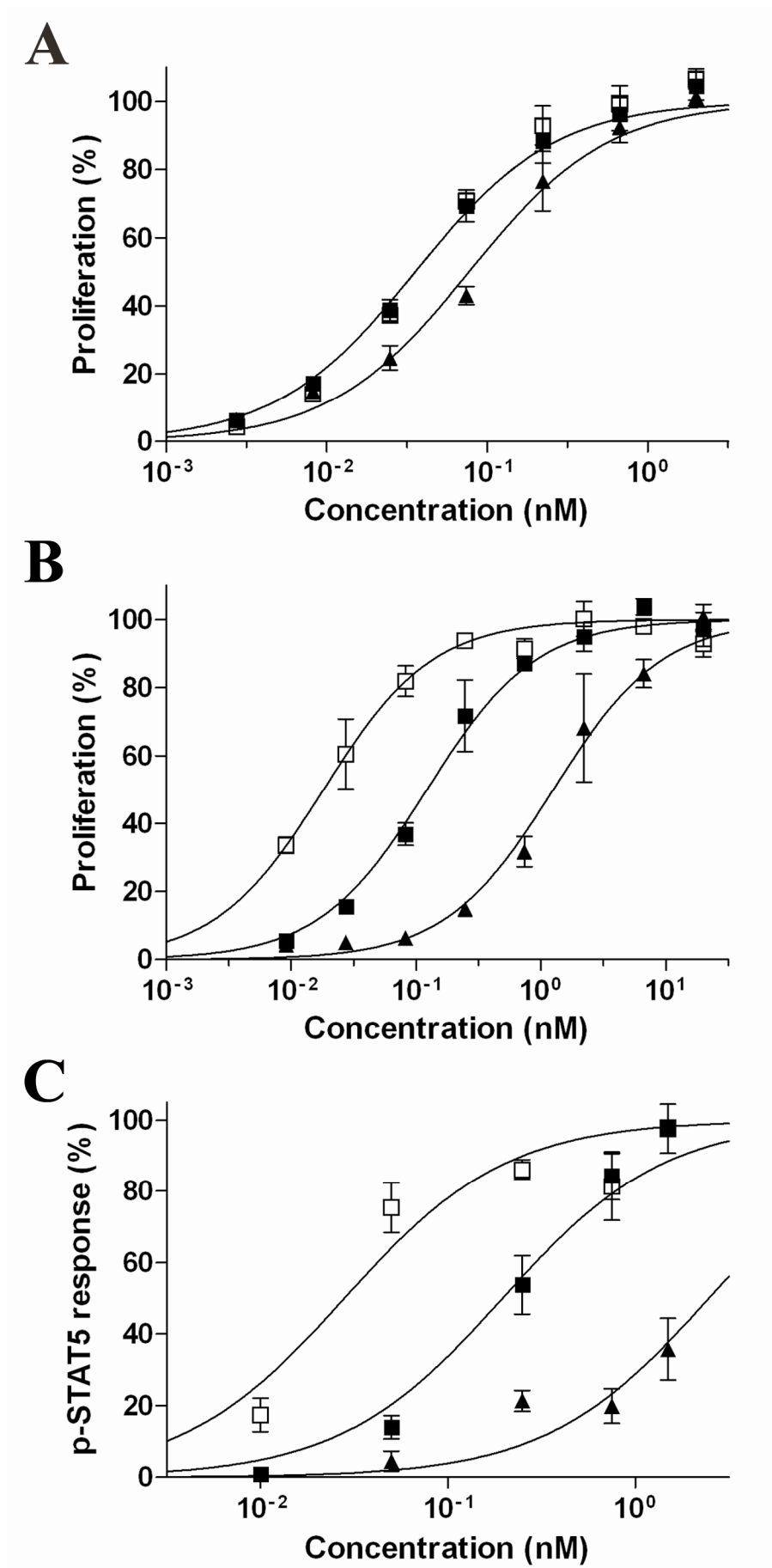


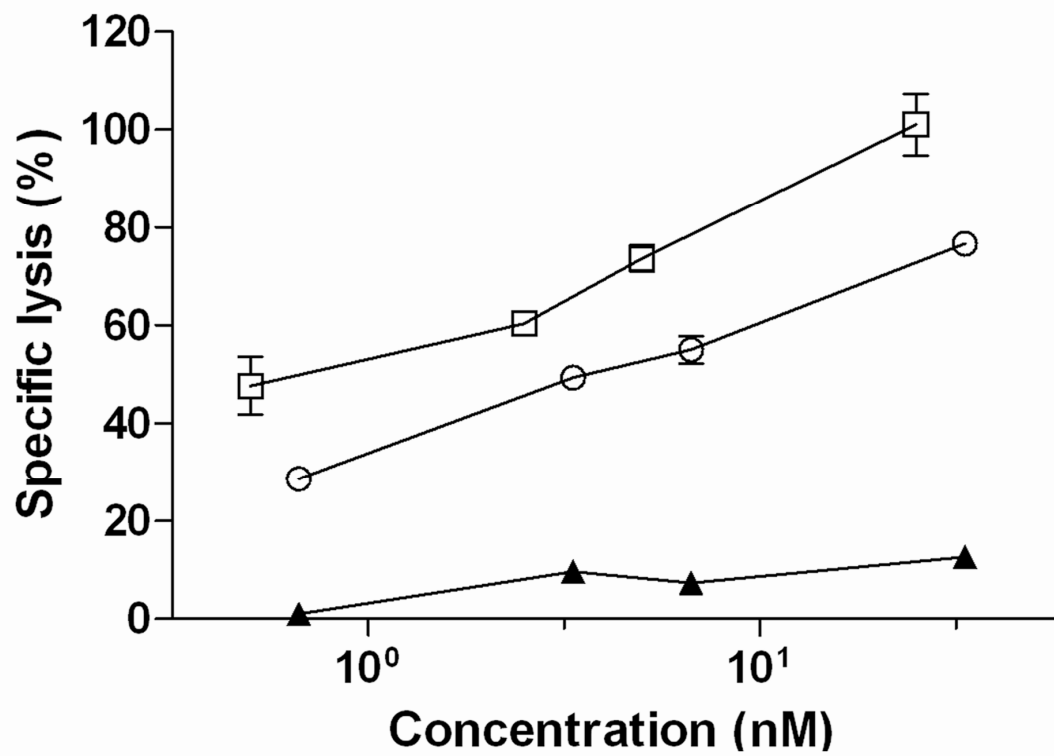
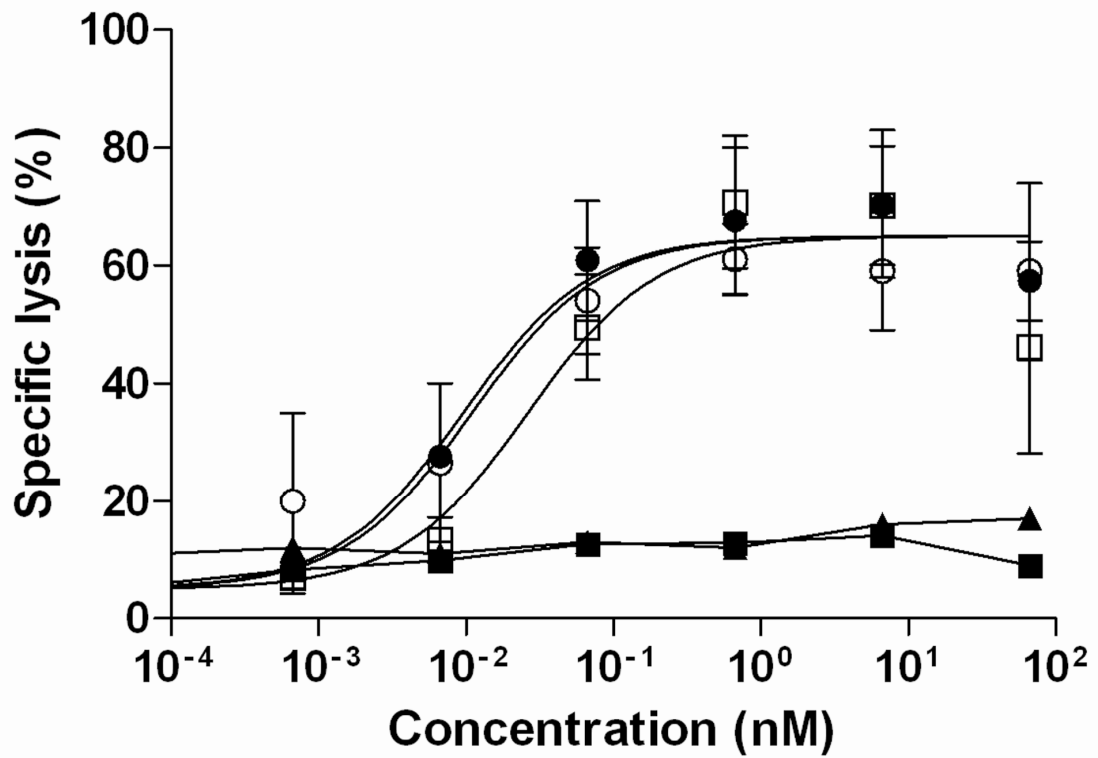
Vincent et al., Figure 1

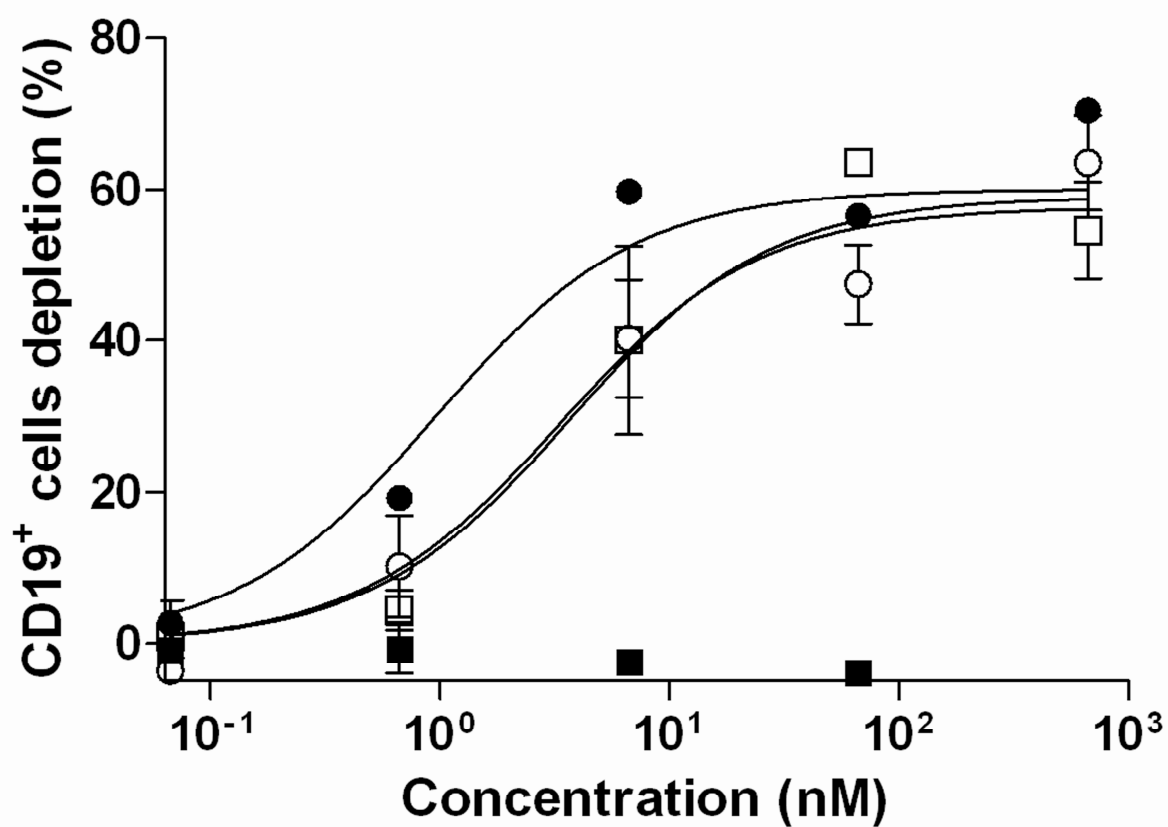


Vincent et al., Figure 2

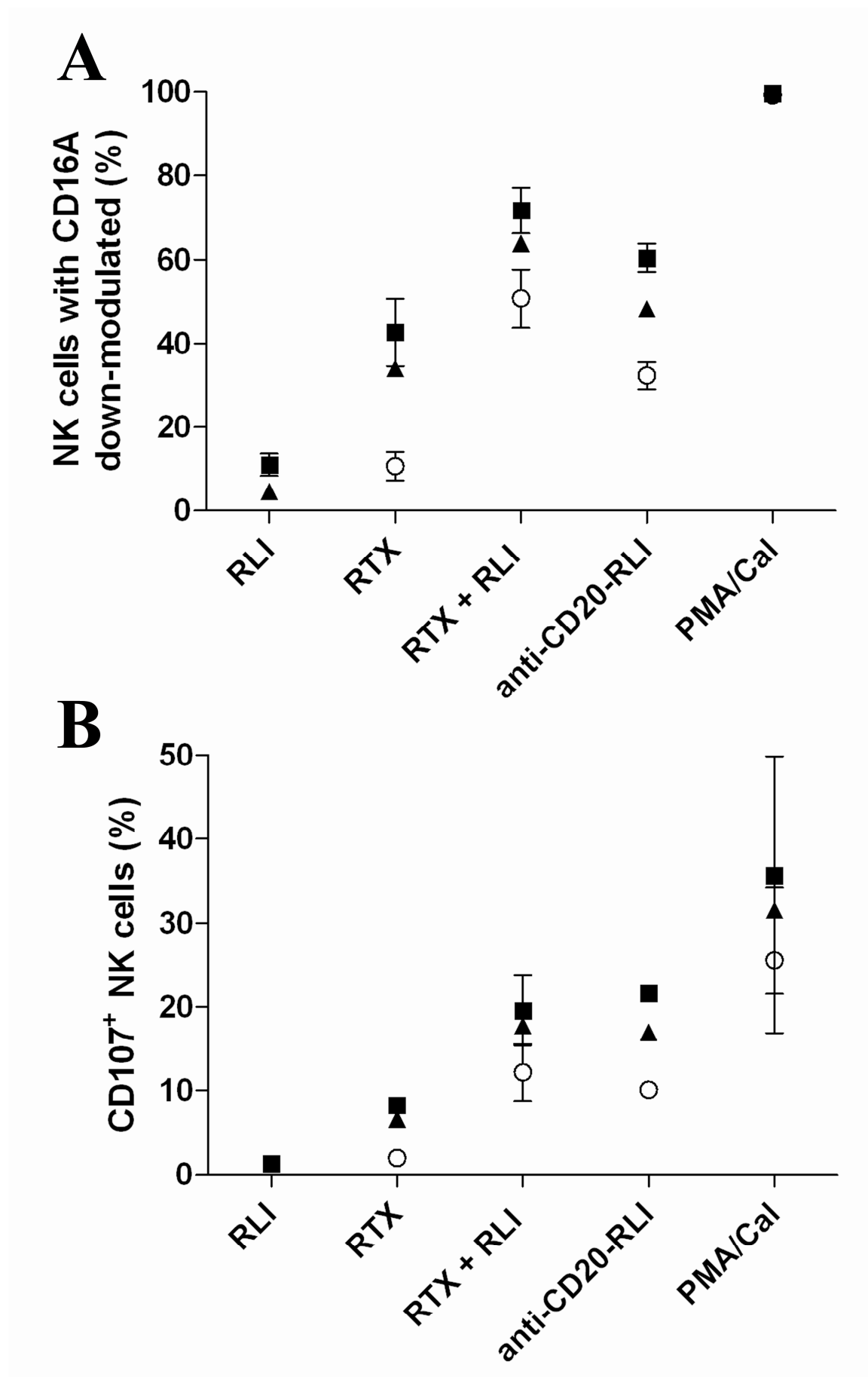




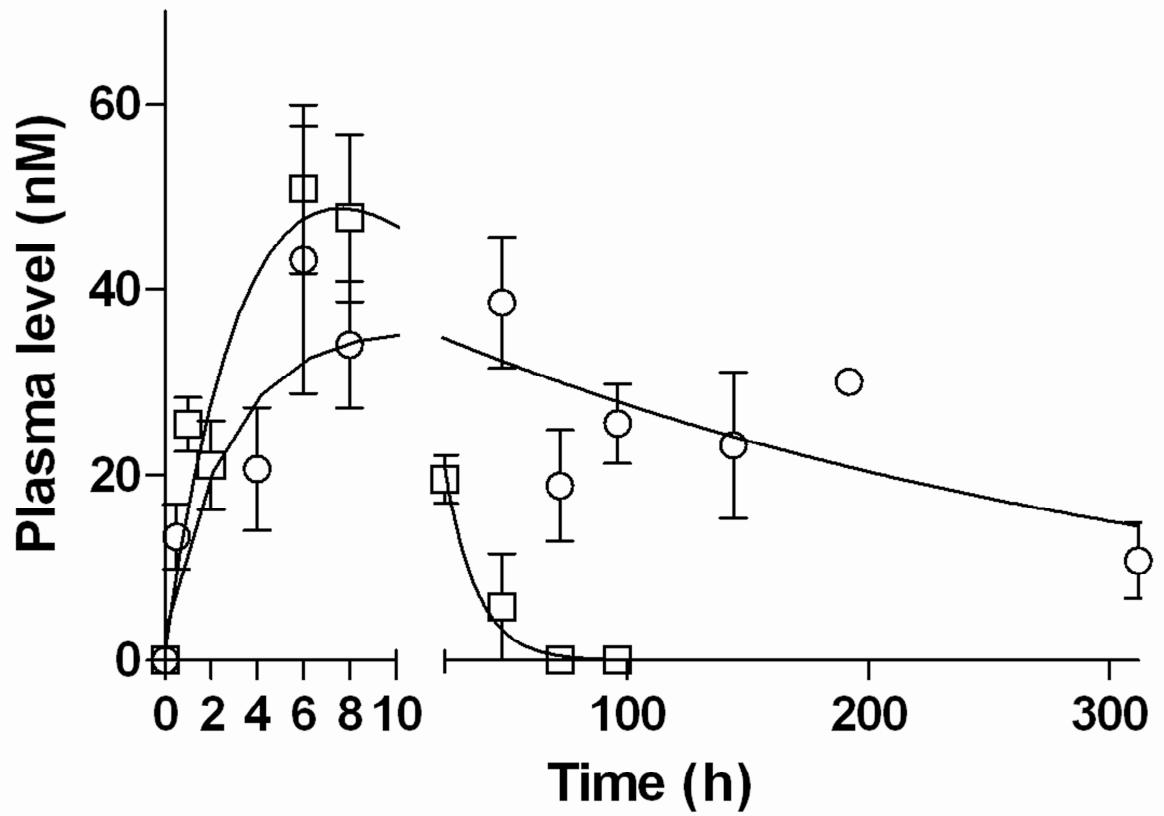
A**B**



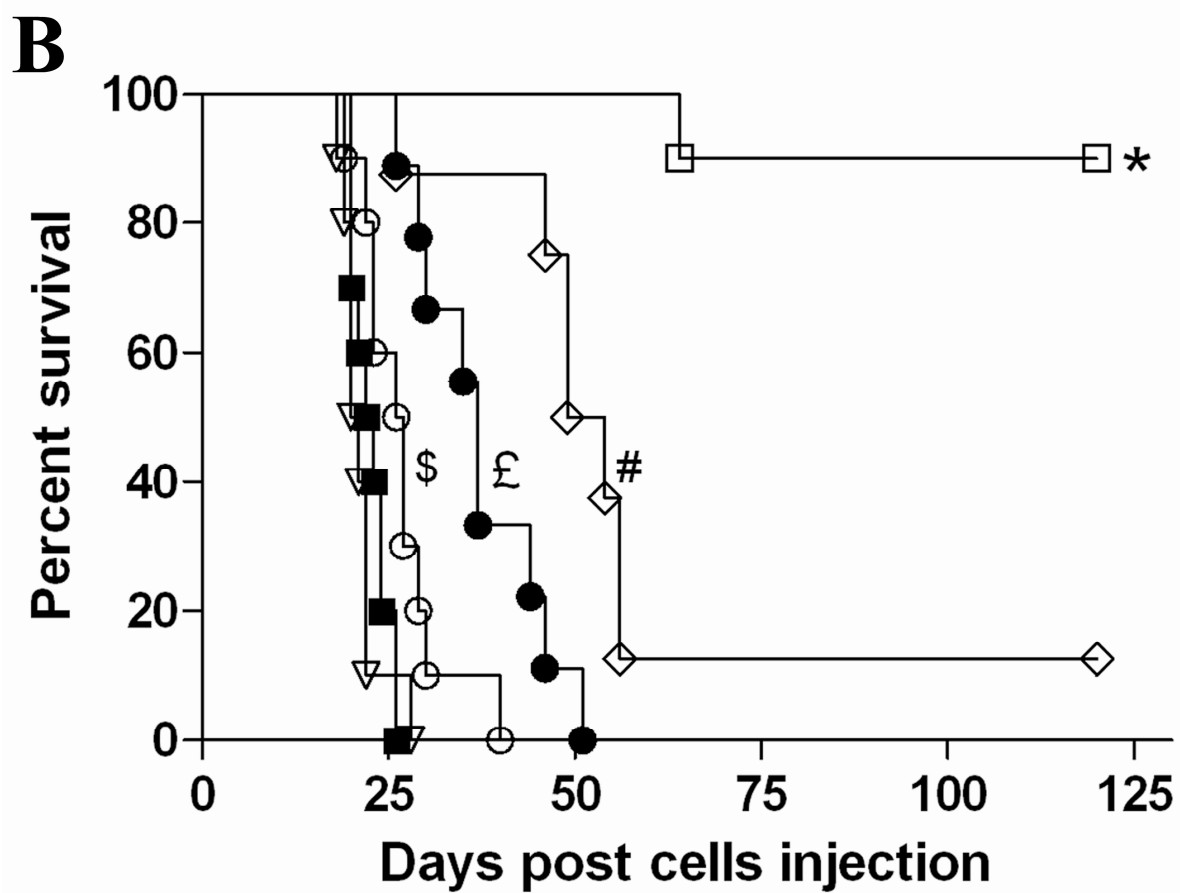
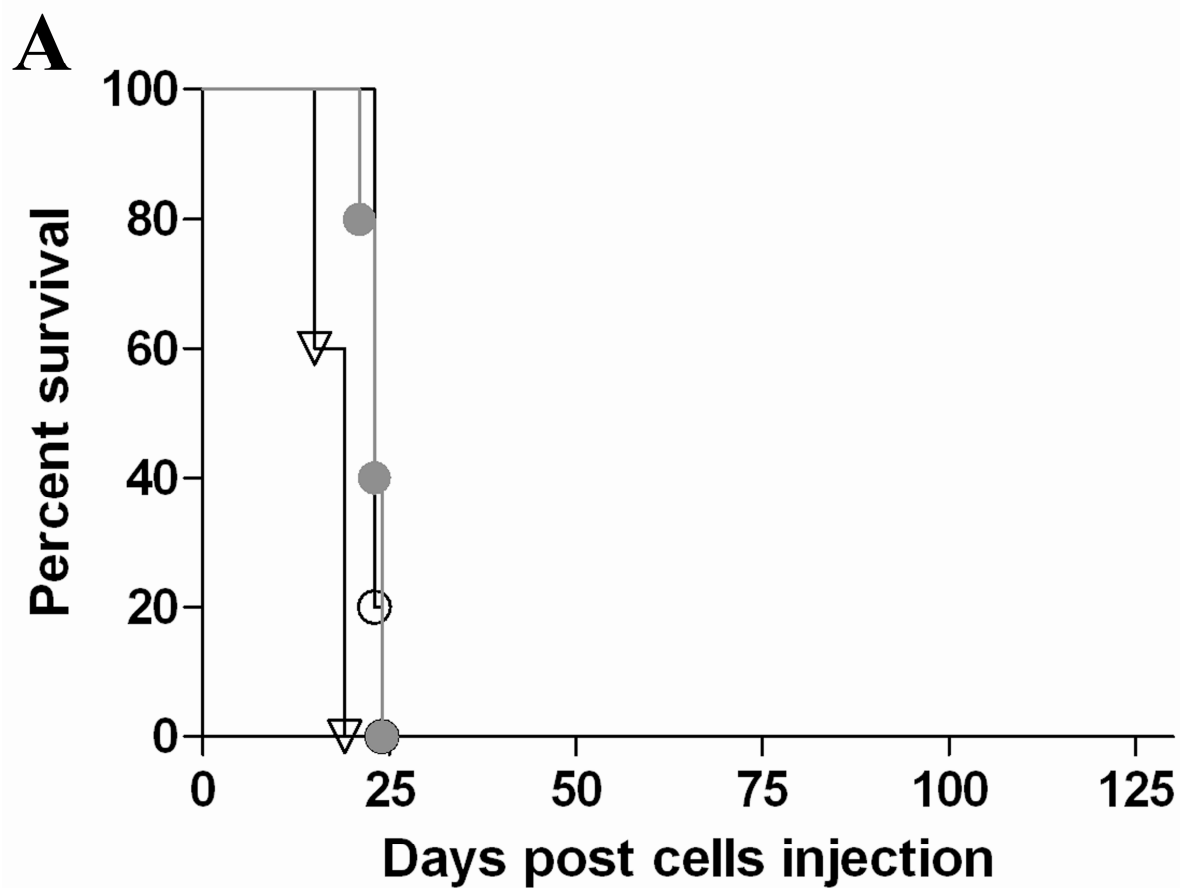
Vincent et al., Figure 6



Vincent et al., Figure 7



Vincent et al., Figure 8



Le FcγRIIIA/CD16A des cellules Natural Killer (NK) humaines:

Régulation de son expression et variabilité des réponses fonctionnelles induites par son engagement

Résumé

L'activation des cellules NKCD56^{dim} par l'engagement ou non du récepteur FcγRIIIA/CD16A entraîne la perte d'expression membranaire de celui-ci par un mécanisme dépendant au moins en partie de la metalloprotéase ADAM17. Celle-ci clive le récepteur entre l'Alanine 195 et la Valine 196 et agit exclusivement en *cis*. La modulation d'expression du FcγRIIIA/CD16A est un marqueur d'activation des cellules NK plus fortement corrélé à la dégranulation qu'à la production d'IFN-γ. L'engagement du récepteur FcγRIIIA/CD16A ou le co-engagement des récepteurs activateurs des NKCD56^{dim} induisent de manière non corrélée la dégranulation et la production d'IFN-γ. Cette dichotomie fonctionnelle varie selon les donneurs et dépend de l'expression des récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH-I. La production d'IFN-γ est ainsi associée à l'expression des KIRs (*Killer like-Immunoglobuline Receptor*) mais pas à celle du NKG2A. Une meilleure compréhension des réponses effectrices dépendantes du FcγRIIIA/CD16A est importante pour améliorer l'efficacité thérapeutique des anticorps monoclonaux à visée anti-tumorale.

Mots-clés : cellules NKCD56^{dim}, FcγRIIIA/CD16A, KIR, NKG2A, CD107, IFN-γ, ADAM17, anticorps monoclonaux thérapeutiques

Abstract

FcγRIIIA/CD16A-dependent or independent activation of CD56^{dim} NK cells induces down-modulation of this receptor. The mechanism partially involves the ADAM17 metalloprotease, which cleaves the FcγRIIIA/CD16A between Alanine 195 and Valine 196 and acts exclusively in *cis*. FcγRIIIA/CD16A down-modulation is a marker of NK cell activation more strongly correlated with degranulation than to IFN-γ-production. FcγRIIIA/CD16A engagement or activating receptors co-engagement on CD56^{dim} NK cell induces degranulation and IFN-γ-production, which are not correlated. This functional dichotomy depends on the donor and on the CMH-I-specific inhibitory receptor expression. IFN-γ-production is thus associated with KIRs (*Killer like-Immunoglobuline Receptor*) but not with NKG2A expression. Understanding the FcγRIIIA/CD16A-dependent functional responses is essential to improve the efficacy of monoclonal antibodies used in cancer therapy.

Key-words: CD56^{dim} NK cell, FcγRIIIA/CD16A, KIR, NKG2A, CD107, IFN-γ, ADAM17, therapeutic monoclonal antibodies