

TLEMSEN
N° d'ordre



UNIVERSITÉ DE TLEMSEN – ABOU-BEKR BELKAÏD

FACULTÉ SNV – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE - BIOMOLIM

THÈSE

Présentée pour l'obtention de

Doctorat 3ème Cycle (LMD) en Sciences Biologiques

Spécialité : Immunologie Appliquée

par :

Zeyneb HADJIDJ

Soutenu le 6 juillet 2020

Intitulé :

Place du Globule Rouge dans l'Immunité Antitumorale à Cellules NK

Sous la direction du Professeur ARIBI Mourad

Jury

Pr. SMAHI Mohamed Chems Eddine	Université de Tlemcen, Algérie	Président
Pr. MESLI Naima	Université de Tlemcen, Algérie	Examinatrice
Pr. TOUIL BOUKOFFA Chafia	USTHB, Algérie	Examinatrice
Dr. MENNECHET Franck	Université de Montpellier, France	Examineur
Pr. ARIBI Mourad	Université de Tlemcen, Algérie	Dir. de Thèse

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

Bertrand Russell (1872 – 1970)

A mon fils Wanis
A mes chers parents,
A mon époux Djalal,
A ma famille, ma belle-famille et mes amis

RESUMÉ

Introduction : Les globules rouges peuvent avoir un effet modulateur sur les cellules immunitaires, ainsi les changements dans leur dynamisme pourraient considérablement influencer leur physiologie, et par conséquent les activités immunitaires des cellules voisines, telles que les cellules NK. Ici, nous avons étudié l'effet des globules rouges et du manque de mouvement cellulaire sur la prolifération, la survie et la régulation des cellules NK périphériques issues de conditions malignes ou normales et stimulées par l'IL-2.

Matériel et méthodes : Les expériences ont été menées sur douze groupes de culture cellulaire, comprenant les cellules NK de patients atteints d'une tumeur maligne solide ou de témoins sains, cultivées seules ou avec des globules rouges autologues ou non autologues sous agitation ou sans agitation.

Résultats : les cellules NK des patients néoplasiques se sont comportées différemment selon les conditions de culture, c'est-à-dire l'agitation et / ou la présence des globules rouges. Par conséquent, la survie des cellules NK a été régulée à la baisse en absence d'agitation ; tandis que l'agitation a non seulement augmenté la survie des cellules, mais également régulé à la baisse les niveaux d'apoptose liée à p53. Aussi, les globules rouges ont augmenté la prolifération des cellules NK, tandis que cet effet a été modulé par l'agitation. De plus, les globules rouges peuvent générer des effets opposés sur la production et la modulation des cytokines protumorales ou immunosuppressives, selon l'origine des cellules NK, c'est-à-dire qu'elles proviennent de conditions néoplasiques ou saines. Enfin, les cellules NK deviennent capables d'exprimer le marqueur régulateur Foxp3 lorsqu'il y a combinaison de trois conditions principales : (i) un traitement avec une forte dose d'IL-2, (ii) la présence de globules rouges et (iii) l'absence de mouvement.

Conclusions : Nos résultats ont montré pour la première fois que la stagnation cellulaire serait fortement impliquée dans l'apoptose des cellules NK périphériques, ainsi que dans la transition vers un phénotype régulateur. De plus, en coopération avec une forte signalisation d'IL-2, les globules rouges et la stagnation peuvent induire une activité immunosuppressive chez les cellules NK. Le mouvement cellulaire et les globules rouges doivent être pris en considération dans les approches thérapeutiques stimulant les activités des cellules NK.

Mots-clés : Agitation, Cancer solide, Cellules NK du sang périphérique stimulées par l'IL-2, Cytokines, Foxp3, Globules rouges, Survie cellulaire.

ABSTRACT

Background: Red blood cells (RBCs) can have a modulatory effect on immune cells; so changes in their dynamism could considerably influence their physiology, and consequently the immune activities of neighboring cells, like natural killer (NK) cells. Herein, we studied the effect of both RBCs and lack of cell movement on the proliferation, survival and regulation of peripheral IL-2-stimulated NK cells from normal and solid malignant conditions.

Materials and methods: Experiments were conducted on twelve cell culture groups, including NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls, cultured alone or with autologous or non-autologous RBCs under shaking or no shaking conditions.

Results: NK cells from neoplastic patients behaved differently depending on the culture conditions including shaking and/or RBCs presence. Therefore, NK cells survival was downregulated in the absence of shaking; whereas, shaking have not only upregulated cell survival, but also downregulated the levels of p53-related apoptosis. Moreover, RBCs enhanced NK cells proliferation; while, this effect was modulated by shaking. Furthermore, RBCs can generate opposite effects on the production and modulation of protumoral or immunosuppressive cytokines, depending on the origin of NK cells, i.e., whether they derive from healthy or solid malignant tumor conditions. Finally, NK cells become able to express Foxp3 regulatory marker when combining three main conditions that include (i) treatment with high dose of IL-2, (ii) presence of RBCs, and (iii) absence of shaking.

Conclusions: Our outcomes showed for the first time that cell stagnation would be markedly involved in peripheral NK cell apoptosis, as well as in switching toward a regulatory phenotype-induced Foxp3. In addition, in cooperation with strong IL-2 signaling, red blood cells and stagnation can induce immunosuppressive activity in NK cells. Cell movement and red blood cells need to be considered in therapeutic approaches that stimulate NK cell activities.

Keywords: Cell survival, Cytokines, Foxp3, Peripheral blood IL-2-stimulated NK cells, Red blood cells, Shaking, Solid cancer

ملخص

مقدمة : يمكن ان يكون للكريات الحمراء تأثير معدل على الخلايا المناعية , كما إن التغيير في ديناميكيتها قد يكون له الأثر الكبير على وظائفها الحيوية و بالتالي على الأنشطة المناعية للخلايا القاتلة الطبيعية لقد قمنا بدراسة تأثير كل من الخلايا الدم الحمراء و نقص حركة الخلايا على تكاثر بقاء و تنظيم الخلايا القاتلة الطبيعية المحيطة ذات أصل ورمي أو صحي محفزة بالانترتوكين -2.

الوسائل و الطرق : تم إجراء تجارب على 12 مجموعة زرع خلوي تحتوي على خلايا قاتلة طبيعية لمرضى يعانون من ورم خبيث صلب أو لأشخاص سالمين مزرعة في وسط زرع خلوي بمفردها او مع خلايا الدم الحمراء ذاتية أو غير ذاتية مع اهتزاز أو بدونه.

النتائج : لقد تجاوزت الخلايا القاتلة الطبيعية لمرضى الأورام بشكل مختلف وذلك حسب ظروف الزرع أي مع الاهتزاز او في وجود خلايا الدم الحمراء و نتيجة لذلك فقد لنقص بقاء الخلايا القاتلة الطبيعية مع غياب الاهتزاز في حين ان الاهتزاز في حين إن الاهتزاز يزيد فقط من بقاء الخلايا و لكن يقلل أيضا من مستويات الموت الخلوي المبرمج المرتبطة ب 53 بينما تم تعديل هذا التأثير بالاهتزاز بالإضافة إلى ذلك يمكن للخلايا الدم الحمراء إن تولد أثار معاكسة على إنتاج أو تعديل السيتوكينات الورمية المنبطة للمناعة. اعتمادا على أصل الخلايا القاتلة الطبيعية سواء كانت ذات أصل ورمي صلب او صحي. وأخيرا تصبح الخلايا القاتلة الطبيعية قادرة على نسخ ال3 عندما يكون هناك مزيج من الشروط الرئيسية الثلاثة. العلاج بجرعة عالية من الانترتوكين 2 وجود خلايا الدم الحمراء و أخيرا غياب الحركة.

الاستنتاج : أظهرت نتائجنا لأول مرة ان ركود الخلايا يساهم بشكل كبير في موت الخلايا المبرمج للخلايا القاتلة الطبيعية وكذلك الانتقال الى النمط ظاهري منظم بالإضافة الى ذلك و بالتعاون مع إشارات قوية للانترلوكين2 يمكن لكريات الدم الحمراء في وجود الركود ان تحت على نشاط منبسط للمناعة. قد تكون حركة الخلايا واحدة من المناهج المستعملة مخبريا المحتملة لتحفيز أنشطة وبقاء الخلايا القاتلة الطبيعية خلال السرطانات الصلبة.

REMERCIEMENTS

Bien qu'une thèse de doctorat ne porte sur sa couverture que le nom d'une seule personne, il est clair que pour la réaliser, l'aide et le soutien d'autres personnes sont nécessaires. Ici, je voudrais remercier les personnes qui m'ont aidé à poursuivre et à atteindre ce stade, que ce soit par leur implication directe dans ma recherche ou leur soutien en cours de route.

Je dois commencer par remercier le Professeur ARIBI Mourad d'avoir dirigé cette thèse et de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire. Au cours de ces dernières années, j'ai grandi en tant que scientifique et en tant que personne, non seulement grâce au mentorat et aux enseignements qu'il m'avait fournis, mais aussi grâce aux défis auxquels il m'avait poussés à me confronter. Je ne serais pas là où je suis actuellement sans ses encouragements, sa rigueur, son orientation et sa confiance. Il m'a donné tellement d'opportunités que peu d'autres étudiants ont la chance d'obtenir, et j'en suis reconnaissante. J'admire vraiment ses profondes connaissances en immunologie et son dévouement à la recherche et aux membres de son équipe, d'autant plus que son expertise n'a jamais manqué de fournir une nouvelle vision sur les données scientifiques.

Je remercie sincèrement les autres membres du jury : le Dr. MENNECHET Franck, Pr. TOUIL BOUKOFFA Chafia et Pr. MESLI Naima d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse ainsi que le Pr. SMAHI Chems Eddine d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Recevez tous ici la marque de mon profond respect.

Je remercie ma collègue et mon amie MESSALI Rabia de m'avoir gardé en équilibre. Merci pour ta gentillesse, ta sympathie, ton soutien, et ta générosité.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie de l'Université Tlemcen, vous avez été formidable. Il y a eu beaucoup de rires, des séances de thérapie d'étudiant à étudiant et le développement de véritables amitiés. J'en ai adoré chaque minute.

Ma famille m'a patiemment aidé tout au long de ma vie, menant - à ce stade - à un doctorat. Merci à tous pour les innombrables années de soutien.

TABLE DES MATIERES

RESUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
ملخص	v
REMERCIEMENTS	vi
TABLE DES MATIERES	vii
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
LISTE DES FIGURES	xiii
Introduction	2
1. Chapitre 1. Revue de la littérature	5
1.1 Cancer et immunosurveillance	6
1.1.1 Tumeurs malignes solides	6
1.1.2 Suppression des Tumeurs	7
1.1.2.1 Suppression intrinsèque	7
1.1.3 Immunoédition du cancer	8
1.1.3.1 Historique	8
1.1.3.2 Elimination	10
1.1.3.3 Equilibre	11
1.1.3.4 Echappement	12
1.1.3.5 Le microenvironnement tumoral et l'immunoédition des cancers	14
1.2 Rôle des cellules NK dans l'immunité antitumorale	15
1.2.1 Généralités	15
1.2.2 Sous populations des cellules NK	16
1.2.3 Développement et maturation des cellules NK	18
1.2.4 Fonctions des cellules NK	20
1.2.4.1 Fonctions effectrices	20
1.2.4.2 Prolifération	23
1.2.4.3 Régulation	24
1.2.4.4 Mémoire	24
1.2.5 Cellules NK et immunité anti-tumorale	25
1.2.5.1 Immunosurveillance	25
1.2.5.2 Résistance tumorale aux cellules NK	26
1.2.6 Immunothérapie à cellules NK	28

1.3 Erythrocytes : Physiologie, récepteurs et signalisation cellulaire	31
1.3.1 Généralités	31
1.3.2 Développement des érythrocytes.....	31
1.3.3 Structure et physiologie des érythrocytes.....	32
1.3.4 Protéome des érythrocytes.....	34
1.3.5 Fonctions des érythrocytes.....	34
1.3.5.1 Échanges gazeux et maintien de l'homéostasie oxydative.....	34
1.3.5.2 Fonctions enzymatiques et métabolisme du glucose.....	35
1.3.6 Rôle des globules rouges dans la réponse immunitaire.....	36
1.3.6.1 Liaison aux chimiokines.....	36
1.3.6.2 Interactions avec les cellules immunitaires	37
1.4 Frontières érythrocytes - microenvironnement tumoral – cellules NK.....	41
1.4.1 Les érythrocytes dans le microenvironnement tumoral	41
1.4.2 Modulation des cellules NK par les érythrocytes	42
1.5 Le mouvement cellulaire.....	43
1.6 Problématique et objectifs	44
1.6.1 Problématique.....	44
1.6.2 Objectifs	44
1.6.3 But.....	44
Chapitre 2. Matériel et méthodes et diffusion des résultats	46
Chapitre 3. Conclusions et perspectives	61
Chapitre 4. Bibliographie	63
Annexes : Implication dans la recherche.....	86

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (Antibody-dependent cellular cytotoxicity)

B

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BiKEs : agents de mobilisation des cellules NK bispécifiques

C

CCL : C-C Motif Chemokine Ligand

CD : Cluster de différenciation (Cluster of différenciation)

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CTLA-4 : Antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand

D

DAMP : Les motifs moléculaires associés aux dommages (Damage-associated molecular patterns)

DARC : Duffy antigen/chemokine receptor

G

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies des granulocytes et des macrophages

GPA : Glycophorine A

GPC : Glycophorine C

H

HAVCR2 : Récepteur cellulaire du virus de l'hépatite A

Hb : Hémoglobine

HCST : Hematopoietic cell signal transducer

HLA-DR : Human Leukocyte Antigen – DR isotype

I

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN : Interféron

IL : interleukine

ILC : Cellules lymphoïdes innées (Innate lymphoid cells)

IRF-2 : Facteur régulateur de l'interféron 2 (interferon regulatory factor 2)

K

KIR : Récepteur inhibiteur de type immunoglobuline (Killer Ig-like receptor)

L

LAG3 : Lymphocyte activation gene 3 protein precursor

LAMP : Protéine membranaire associée aux lysosomes

LGL : Grands lymphocytes granulaires (Large granular lymphocyte)

LPS : Lipopolysaccharides

M

MDSC : Cellules myéloïdes suppressives (myeloid-derived suppressor cells)

MEF : Myocyte enhancer factor

MICA : MHC class I polypeptide-related sequence A

MITF : (Microphthalmia-associated transcription factor)

mTOR : cible de la rapamycine chez les mammifères (Mammalian target of rapamycin)

N

NCAM : Molécule d'adhésion des cellules neurales (Neural cell adhesion molecule)

NK : Cellules tueuses naturelles (Natural killer cells)

P

p53 : protéine 53 (tumor protein 53)

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique (Peripheral blood mononuclear cells)

PBNNK : Cellules NK du sang périphérique (Peripheral blood NK cells)

PD-1 : programmed cell death protein 1

PD-L1 : Programmed death-ligand 1

R

Rh : Protéine rhésus

RhAG : Glycoprotéines associées au Rh

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)

S

scFv : Fragment variable à chaîne unique (single-chain variable fragment)

SMT : Tumeur maligne solide (Solid malignant tumor)

STAT: signal transducteur et activateur de transcription (Signal transducer and activator of transcription)

T

TCR : récepteur des cellules T (T Cell Receptor)

TGF- β : Facteur de transformation cellulaire β (Transforming growth factor β)

TIM3 : Récepteur cellulaire du virus de l'hépatite A

TNF : Facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor)

TNFR : Récepteur de TNF

TRAIL : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

TRAILR : Récepteur de TRAIL

Treg : Cellules T régulatrices

TriKEs : agents de mobilisation des cellules NK trispécifiques

TYROBP : protein tyrosine kinase-binding protein

V

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular endothelial growth factor)

X

XCL : X-C Motif Chemokine Ligand

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Les différents organes touchés par les cancers solides

Figure 1.2. Immunoédition du cancer : La théorie des 3E

Figure 1.3. Phénotype des cellules NK

Figure 1.4. Développement des cellules NK chez l'homme

Figure 1.5. Activation des cellules NK

Figure 1.6. Rôle des cellules NK dans la surveillance immunitaire

Figure 1.7. Interaction entre les cellules NK et d'autres cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral

Figure 1.8. Maturation des érythrocytes

Figure 1.9. Effet des globules rouges sur les cellules immunitaires

INTRODUCTION

Introduction

Les cellules NK (Natural Killer) sont la première ligne de défense immunitaire contre le cancer. Elles représentent les principaux effecteurs impliqués dans l'immunité innée et jouent un rôle clé dans la surveillance immunitaire grâce à leur capacité de reconnaître et de détruire une large gamme de cellules transformées (Caligiuri, 2008; Cho and Campana, 2009; Vivier *et al.*, 2011). Elles sont parmi les cellules les plus prometteuses pour les thérapies anticancéreuses (Sharma and Das, 2018), et peuvent être appliquées de façon universelle car elles sont particulièrement efficaces pour le traitement des tumeurs malignes solides qui présentent une perte d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) comme mécanisme de fuite immunitaire des lymphocytes T. Par ailleurs, contrairement à la thérapie par vaccination ou à la thérapie cellulaire adoptive utilisant des cellules T spécifiques aux antigènes, l'identification des antigènes tumoraux cibles n'est pas requise pour la thérapie par les cellules NK (Lim *et al.*, 2013). Cependant, en tant que cellules d'origine lymphoïde (jusqu'à 15% des lymphocytes humains circulants), le défi majeur de l'immunothérapie à base de cellules NK est leur faible fréquence (Aribi, 2017; Millard *et al.*, 2013). Ceci justifie la difficulté d'avoir un nombre suffisant de cellules fonctionnelles (Sharma and Das, 2018).

Les cellules NK sont caractérisées par l'expression des marqueurs phénotypiques CD56 et CD16 et l'absence de CD3 et CD19 (Bae and Lee, 2014). La plus grande fraction des cellules NK du sang périphérique (PBNKC) ($\geq 90\%$) correspond à la sous-population cytotoxique (Cella *et al.*, 2014), tandis que les cellules NK restantes sont spécialisées dans la production de cytokines et l'immunorégulation (Megan A Cooper *et al.*, 2001). Les PBNKC expriment des récepteurs fonctionnels de l'interleukine-2 (IL-2) (Millard *et al.*, 2013), un facteur de croissance lymphocytaire principalement produit par les lymphocytes T (Dunne *et al.*, 2001, p. 15). Il joue un rôle clé dans la différenciation, l'activation, la prolifération, la survie et les activités fonctionnelles des PBNKC (Meazza *et al.*, 2011). L'IL-2 peut également améliorer la cytotoxicité des cellules NK contre un large éventail de cellules tumorales humaines, y compris les cellules de tumeurs solides (Gasteiger *et al.*, 2013), et les stimuler à produire des cytokines, en particulier l'interféron gamma (IFN- γ) (Fehniger *et al.*, 2003). De plus, en réponse à la stimulation par l'IL-2, l'interaction entre les PBNKC hautement purifiés présente une augmentation synergique de leur activation, prolifération et fonction antitumorale (Kim *et al.*, 2015).

Les globules rouges constituent 40 à 50% du sang humain total (Bizjak *et al.*, 2015) et représentent les cellules les plus abondantes du corps (Gothoskar, n.d.). Plusieurs études ont signalé des anomalies hémostatiques et une altération de la fonction et de la structure des globules rouges dans les maladies malignes (de Castro *et al.*, 2014; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2015). Il a également été démontré que les globules rouges extravasculaires favorisent fortement la prolifération des cellules tumorales, la croissance des tumeurs, l'angiogenèse tumorale, le recrutement des macrophages non classiques M2 et la résistance thérapeutique (Yin *et al.*, 2015). Aussi, il a été suggéré que les globules rouges peuvent avoir un effet modulateur sur les activités immunologiques et cet effet peut contribuer au déclenchement et à la préservation des réponses inflammatoires en favorisant un état inflammatoire chronique (Buttari *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2015). En outre, des études antérieures (Sauri *et al.*, 1996; Shau and Kim, 1994) ont rapporté que les globules rouges auraient la capacité d'induire, de promouvoir et de moduler l'activité cytotoxique à médiation cellulaire des PBNKC. Il convient de noter que les globules rouges peuvent être considérés comme des cellules flexibles et circulantes par excellence. Ils ont la grande capacité d'atteindre les vaisseaux sanguins et capillaires de tout le corps grâce à leur capacité de déformation naturelle et leurs propriétés d'agrégation réversibles. Par ailleurs ces propriétés puissent être modifiées en particulier lorsqu'elles sont soumises à des forces externes telles que des contraintes hydrodynamiques (Dupire *et al.*, 2012). Sachant que n'importe quelle cellule est capable de détecter des changements dans son environnement mécanique et de promouvoir des changements et des adaptations de structure et du fonctionnement des tissus (Benjamin and Hillen, 2003), des changements dans les propriétés des globules rouges peuvent se produire à n'importe quel endroit, y compris les organes et les tissus lymphoïdes périphériques, où ils peuvent entrer en contact avec des cellules malignes et / ou des cellules de l'immunité innée, y compris les cellules NK. Finalement, il serait tout à fait possible que le changement du dynamisme des globules rouges influence considérablement leur physiologie, et par conséquent les activités des cellules voisines. Dans ce contexte, nous avons essayé pour la première fois de montrer que le faible mouvement ou la stagnation des globules rouges et des cellules NK stimulées par l'IL-2 provenant de patients atteints d'une tumeur maligne solide (SMT) pouvait influencer la prolifération et la survie des cellules NK, ainsi que leur capacité à produire des cytokines antitumorales.

CHAPITRE 1

1. Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1 Cancer et immunosurveillance.....	6
1.2 Rôle des cellules NK dans l'immunité antitumorale	15
1.3 Erythrocytes : Physiologie, récepteurs et signalisation cellulaire.....	31
1.4 Frontières érythrocytes - microenvironnement tumoral – cellules NK	41
1.5 Le mouvement cellulaire.....	43
1.6 Problématique et objectifs	44

1.1 Cancer et immunosurveillance

1.1.1 Tumeurs malignes solides

Certains facteurs entraînent la transformation d'une cellule normale en une cellule néoplasique qui échappe au contrôle. Bien que la plupart des cellules ne survivent pas à cette transformation, un clone capable de croître finira par apparaître si les facteurs favorisant les néoplasies persistent. Ces facteurs peuvent être environnementaux (produits chimiques, virus oncogène, radiations) ou héréditaires, favorisant des conditions « précancéreuses » dans lesquelles la tumeur est plus susceptible de se former. Une prolifération cellulaire continue pour la réparation des tissus endommagés, souvent à cause d'une inflammation continue, est responsable d'une plus grande probabilité de mutation. La majorité des néoplasmes humains surviennent après des mutations impliquant une activité oncogène ou des gènes suppresseurs de tumeurs, qui ne parviennent plus à contrôler la croissance cellulaire (Jones *et al.*, 2010).

Les cancers solides malins sont nommés en fonction de la zone dans laquelle ils commencent à se former et du type de cellules dont ils sont constitués (Figure 1.1), même s'ils se propagent dans d'autres parties du corps :

1.1.1.1 Les carcinomes :

Sont généralement des néoplasmes malins provenant de tissus embryologiquement dérivés d'ectoderme ou d'endoderme comme le carcinome épidermoïde du col de l'utérus, l'adénocarcinome de l'estomac, le carcinome hépatocellulaire, ou le carcinome à cellules rénales. Ils proviennent des surfaces épithéliales (tractus gastro-intestinal, les voies respiratoires, les voies urogénitales, les voies biliaires, la peau, etc.) et des organes à canaux épithéliaux (sein, pancréas, glande salivaire, foie, etc.). Les glandes endocrines, y compris les testicules et les ovaires, peuvent également développer des carcinomes. En général, les carcinomes sont composés de cellules de forme polygonale (Berman, 2005).

Les carcinomes qui forment des configurations glandulaires sont appelés adénocarcinomes, tandis que les carcinomes qui forment des nids solides de cellules avec des frontières distinctes, des ponts intercellulaires et un cytoplasme kératinisé rose sont appelés carcinomes épidermoïdes (Berman, 2005).

1.1.1.2 Les sarcomes :

Sont généralement des tumeurs malignes résultant du mésoderme (tissus conjonctifs) comme le léiomyosarcome, le chondrosarcome, l'ostéosarcome, ou le liposarcome. Elles proviennent des tissus mous (tissus conjonctifs tels que le cartilage, le fascia, les muscles lisses ou squelettiques, les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques, les revêtements d'organes tels que le mésothélium). En général, les sarcomes sont composés de cellules fusiformes très pléomorphes et sont généralement gros et mauvais (Berman, 2005).

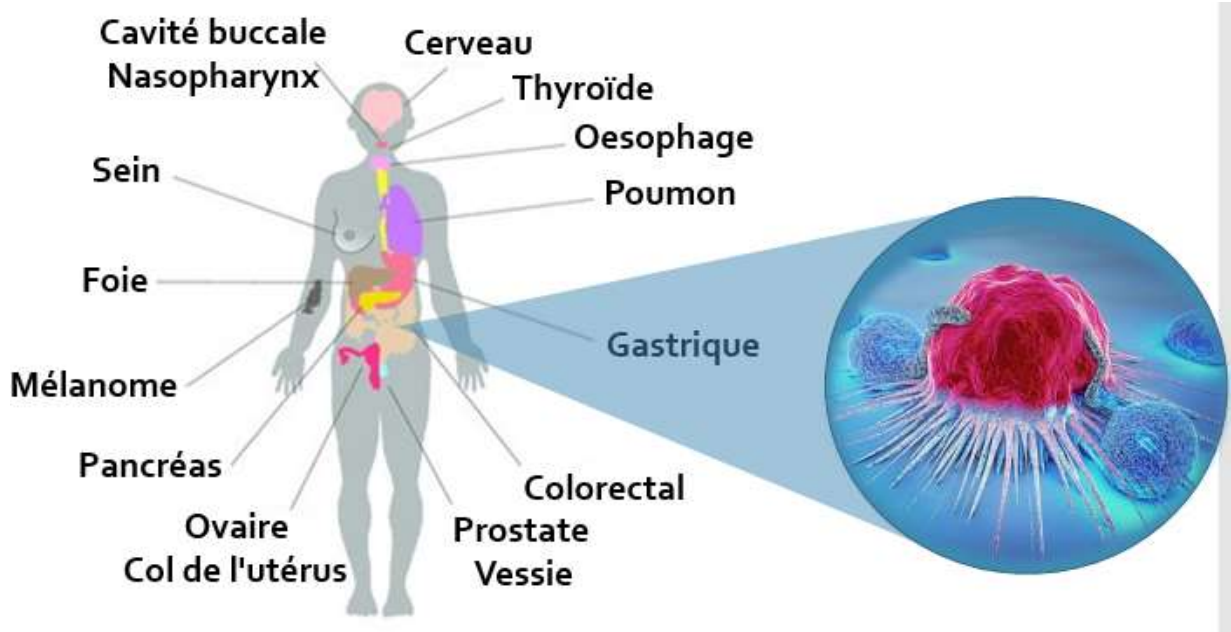


Figure 1.1. Les différents tissus touchés par les cancers solides

1.1.2 Suppression des Tumeurs

Il existe plusieurs mécanismes intrinsèques et extrinsèques de suppression des tumeurs qui empêchent la transformation d'une cellule normale et son développement en tumeur.

1.1.2.1 Suppression intrinsèque

En général, la sénescence et l'apoptose empêchent les cellules d'acquérir des capacités de prolifération sans signaux environnementaux et agissent comme une barrière pour le développement des cellules néoplasiques (Vesely *et al.*, 2011). En effet, différentes molécules comme la protéine p53 (tumor protein 53) qui détectent les perturbations génomiques provoquées par des altérations mutagènes induisent la sénescence (Xue *et al.*, 2007). Par

ailleurs, la réponse au stress cellulaire, à une blessure, à un manque de signal de survie ou à une altération de l'intégrité mitochondriale entraîne la libération d'effecteurs pro-apoptotiques qui déclenchent la mort cellulaire. L'apoptose peut également être induite par la ligature des récepteurs de mort de surface cellulaire comme le récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR), le récepteur TRAIL-R2 du Ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale (TNF) (TRAIL) et le récepteur Fas/CD95 avec le ligand correspondant de la superfamille des TNF pour induire la formation d'un complexe de signalisation qui active la caspase apicale 8 responsable de l'initiation de l'apoptose (Danial and Korsmeyer, 2004).

1.1.2.2 Suppression extrinsèque des tumeurs

Le système immunitaire joue un rôle clé dans la prévention contre le cancer en empêchant l'apparition des tumeurs induites par des virus ou l'installation d'un environnement inflammatoire propice à la cancérogenèse par l'élimination rapide des agents pathogènes et la résolution de l'inflammation. Le système immunitaire a aussi la capacité de détecter et éliminer les cellules tumorales naissantes sur la base de l'expression antigénique des molécules spécifiques aux tumeurs. C'est le concept d'immunosurveillance (Swann and Smyth, 2007).

1.1.3 Immunoédition du cancer

Le système immunitaire peut jouer un double rôle dans le cancer. Il peut non seulement prévenir ou contrôler la croissance tumorale en détruisant les cellules cancéreuses ou en inhibant leur croissance, mais aussi favoriser la progression tumorale soit en sélectionnant des cellules tumorales qui sont plus aptes à survivre dans un organisme immunocompétent ou en établissant dans le microenvironnement tumoral des conditions qui facilitent la croissance tumorale (Schreiber *et al.*, 2011). Ces fonctions apparemment paradoxales sont séparables en fonction du temps, de la nature de l'événement transformant, des agents immunitaires impliqués dans chaque processus et de la nature des antigènes spécifiques exprimés par les cellules transformées (Mittal *et al.*, 2014).

1.1.3.1 Historique

L'histoire de l'immunité anticancéreuse remonte aux années 1900 lorsque Paul Ehrlich a remarqué que le cancer serait assez fréquent chez les organismes sans protection immunitaire (Ehrlich, 1908). Cependant, la composition et la fonction du système immunitaire étaient si peu connues à cette époque qu'il n'était pas possible d'évaluer la validité de son hypothèse. Il aurait fallu près de 50 ans pour que l'idée du contrôle immunitaire du cancer refasse surface, stimulée

en grande partie par une meilleure compréhension du système immunitaire et la démonstration de l'existence d'antigènes tumoraux (Old and Boyse, 1964). Ces progrès ont fourni les bases de l'hypothèse d'immunosurveillance fondée par M.F. Burnet (Burnet, 1957) et L. Thomas (Thomas and Lawrence, 1959), un concept qui propose que l'immunité adaptative est responsable de la prévention du développement du cancer chez des individus immunocompétents (Bhatia and Kumar, 2015) et que les cellules tumorales naissantes peuvent être éliminées via l'expression de nouveaux antigènes, ce qui provoque une réaction immunitaire avec régression de la tumeur sans aucun indice clinique de son existence (Fridman, 2018). Cependant, les études ultérieures de Stutman ont peu soutenu cette hypothèse après avoir réalisé des expériences montrant que la sensibilité au cancer chez des souris immunocompétentes était similaire à celle des souris nues qui présentaient une immunodéfiance majeure mais non totale (Stutman, 1976, 1974). Sur la base de ces résultats, l'hypothèse de l'immunosurveillance du cancer a été largement abandonnée, et aussitôt des arguments supplémentaires ont commencé à émerger, exposant les raisons pour lesquelles l'immunosurveillance du cancer ne pouvait pas se produire (Schreiber *et al.*, 2011). Certains chercheurs ont estimé que la présence d'une immunité résiduelle chez les animaux utilisés pour ces études a empêché l'obtention des résultats attendus (Dunn *et al.*, 2004, 2002).

Dans les années 1990, des modèles améliorés de souris immunodéficientes sont devenus monnaie courante, ce qui a permis à certaines équipes de réévaluer le rôle de l'immunité dans la lutte contre le cancer. L'intérêt pour l'immunosurveillance du cancer a refait surface après la découverte de l'importance de IFN- γ dans le rejet des cellules tumorales transplantées (Dighe *et al.*, 1994). Mais aussi par la démonstration de l'importante sensibilité aux cancérogènes et aux tumeurs primitives spontanées chez les souris dépourvues du récepteur d'IFN- γ ou du signal transducteur et activateur de transcription 1 (STAT1), requis pour la signalisation du récepteur de l'IFN ou de l'immunité adaptative, c'est-à-dire les souris RAG2^{-/-} dépourvues de cellules T, de cellules B et de cellules T tueuses naturelles (NKT) (Vijay Shankaran *et al.*, 2001). En même temps d'autres laboratoires ont rapporté des résultats similaires et, parallèlement, ces résultats ont démontré que le système immunitaire pouvait fonctionner comme un suppresseur de tumeurs d'origine extrinsèque (Vesely *et al.*, 2011).

En 2001, le groupe RD Schreiber (V. Shankaran *et al.*, 2001) a réussi à définir les bases de l'immuno-oncologie moderne. Dans une étude fondamentale, ils ont démontré que les tumeurs formées chez des souris dépourvues d'un système immunitaire intact étaient, plus immunogènes, et donc classées comme «non éditées», par rapport à des tumeurs similaires

dérivées de souris immunocompétentes, et donc qualifiées comme «éditées». Ceci a révélé que le système immunitaire contrôle quantitativement et qualitativement les tumeurs (Dunn *et al.*, 2002) et a conduit à l'élaboration d'une nouvelle théorie de l'immunité tumorale connue sous le nom de «théorie des trois E» ou « immunoédition du cancer ». La théorie a proposé trois étapes: 1) l'élimination des tumeurs à un stade précoce (précédemment connue sous le nom d'hypothèse de surveillance immunitaire), 2) l'équilibre, lorsque le système immunitaire contrôle la tumeur et 3) l'échappement, lorsque les cellules tumorales sont entièrement immunoéditées et se développent sans contrôle immunitaire (Fridman, 2018). Depuis lors, cette théorie a été à la base de la plupart des travaux menés dans le domaine de l'immunité anticancéreuse (Smyth *et al.*, 2006) et est considérée dans le monde entier comme modèle pour comprendre les interactions des cellules cancéreuses avec le système immunitaire de l'hôte (Fridman, 2018).

Alors que la phase d'élimination a été largement déduite à partir des études sur des modèles de tumeurs chez la souris, les preuves des phases d'équilibre et d'évasion proviennent d'analyses de cancers chez la souris et l'homme. Par conséquent, l'échappement au contrôle immunitaire est désormais reconnu comme l'une des caractéristiques du cancer (Mittal *et al.*, 2014). Bien que les études sur le développement de tumeurs chez la souris aient été le principal moteur de la formulation de l'hypothèse d'immunoédition du cancer, d'autres preuves ont depuis été obtenues indiquant que l'immunoédition se produit également chez l'homme et peut modifier le cours du développement de la tumeur chez les patients cancéreux (Schreiber *et al.*, 2011). Le succès des inhibiteurs du point de contrôle immunitaire (par exemple, anti-CTLA-4 et anti-PD-1/-PD-L1) en clinique démontre en outre que l'immunoédition du cancer se produit chez les patients atteints de cancers avancés et que ce processus peut être réinitialisé par thérapie (Teng *et al.*, 2015).

1.1.3.2 Elimination

La phase d'élimination est mieux décrite comme une version mise à jour de l'immunosurveillance du cancer (Schreiber *et al.*, 2011), dans laquelle les cellules de l'immunité innée et adaptative coopèrent pour détecter et détruire les tumeurs naissantes bien avant qu'elles ne deviennent cliniquement apparentes (Smyth *et al.*, 2006) (Figure 1.2). Parmi les mécanismes de détection figurent les « signaux de danger » classiques tels que les IFN de type I, induits dans une phase précoce du développement de la tumeur. Ces cytokines activent les cellules dendritiques et favorisent l'induction de réponses immunitaires anti-tumorales adaptatives. Cependant, les rôles des différentes molécules de motifs moléculaires associés aux dommages

(DAMP) doivent également être pris en compte car ils sont libérés soit directement par les cellules tumorales mourantes ou par les cellules des tissus endommagés lorsque les tumeurs solides commencent à se développer de manière invasive (Sims *et al.*, 2009). Un autre mécanisme potentiel implique des ligands de stress tels que MICA/B chez l'homme qui sont largement exprimés à la surface des cellules tumorales. Ces ligands se lient aux récepteurs activateurs des cellules de l'immunité innée, entraînant la libération des cytokines pro-inflammatoires et immunomodulatrices, qui à leur tour établissent un microenvironnement qui facilite le développement d'une réponse adaptative spécifique à la tumeur (Guerra *et al.*, 2008). Par ailleurs, une réponse efficace nécessite l'expression supplémentaire d'antigènes tumoraux capables d'induire l'expansion des cellules effectrices TCD4⁺ et TCD8⁺ (Schreiber *et al.*, 2011). Ainsi, une activation coordonnée et équilibrée de l'immunité innée et adaptative est nécessaire pour une élimination complète de la tumeur naissante. Si la destruction des cellules tumorales arrive à son terme, la phase d'élimination représente un point final du processus d'immunoédition du cancer. En cas d'élimination partielle, le cancer entre dans la phase suivante : l'immunoédition, phase d'équilibre (Koebel *et al.*, 2007).

1.1.3.3 Equilibre

Certaines cellules cancéreuses peuvent survivre à la phase d'élimination pour passer à la phase d'équilibre qui représente l'étape intermédiaire et parfois la plus longue du processus d'immunoédition du cancer (Bhatia and Kumar, 2015). Au cours de cette phase, un équilibre dynamique s'installe entre le système immunitaire et les cellules tumorales (Figure 1.2). Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ contrôlent mais n'éliminent pas complètement les populations hétérogènes de cellules tumorales. Ils maintiennent les cellules tumorales résiduelles dans un état fonctionnel de dormance (Vesely *et al.*, 2011). Ces cellules tumorales latentes peuvent résider chez les patients pendant des décennies avant de reprendre la croissance sous forme de tumeurs primaires récurrentes ou de métastases (Aguirre-Ghiso, 2007). De plus, ces cellules se sont révélées hautement immunogènes, mais vers la fin de cette phase, en raison d'une interaction constante entre la tumeur et le système immunitaire pendant une longue période, certaines cellules tumorales peuvent modifier ou sculpter leur phénotype laissant apparaître de nouvelles variantes qui peuvent être moins immunogènes et plus résistantes (Smyth *et al.*, 2006). En fonction de l'immunogénicité cellulaire, deux résultats sont supposés se produire. Le système immunitaire peut éliminer toutes les cellules tumorales ou bien, la tumeur ne devient plus sensible à une attaque immunitaire et progresse vers une troisième phase d'évasion (Teng *et al.*, 2008).

1.1.3.4 Echappement

La phase d'échappement représente la phase finale du processus d'immunoédition (Figure 1.2). Dans cette phase, les cellules cancéreuses qui ont acquis la capacité de contourner la reconnaissance et / ou la destruction immunitaire se multiplient et donnent naissance à des tumeurs cliniquement détectables et à croissance progressive (Teng *et al.*, 2015). Les stratégies d'échappement sont facilitées par un certain nombre de mécanismes :

Les cellules tumorales développent une résistance à la cytotoxicité par induction de mécanismes anti-apoptotiques impliquant une activation persistante de facteurs de transcription pro-oncogènes tels que STAT3 ou l'expression de molécules effectrices anti-apoptotiques telles que Bcl-2 (Bhatia and Kumar, 2015). De plus, la perte d'expression de l'antigène tumoral représente aussi l'un des principaux mécanismes d'échappement. Cette perte peut se produire d'au moins trois façons: (i) par l'émergence de cellules tumorales qui manquent d'expression d'antigènes, (ii) par la perte des protéines du CMH de classe I qui présentent les antigènes aux cellules T spécifiques de la tumeur, ou (iii) par la perte de la fonction de traitement de l'antigène dans la cellule tumorale qui est nécessaire pour produire l'épitope peptidique antigénique et le charger sur le CMH de classe I. Toutes ces altérations sont probablement dues à une combinaison d'instabilité génétique inhérente à toutes les cellules tumorales et au processus d'immunosélection (Khong and Restifo, 2002). Le résultat final est la génération via un processus de sélection darwinien de variantes de cellules tumorales faiblement immunogènes qui deviennent invisibles au système immunitaire et ainsi acquérir la capacité de croître progressivement (Schreiber *et al.*, 2011).

Une fuite peut aussi résulter de l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur. D'une part, ce sont les cellules tumorales qui favorisent le développement d'un tel état en produisant des cytokines immunosuppressives telles que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de transformation cellulaire β (TGF- β), les galectines ou l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et le recrutement des cellules immunitaires régulatrices qui fonctionnent comme les effecteurs de l'immunosuppression. En outre, les cellules T régulatrices (Treg) et les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) sont deux types principaux de populations de leucocytes immunosuppresseurs qui jouent un rôle clé dans l'inhibition des réponses antitumorales (Schreiber *et al.*, 2011).

Par ailleurs, les cellules tumorales plongent dans une bataille active contre la réponse immunitaire en attaquant les cellules de l'immunité innée et adaptative. Les cellules tumorales

détournent les cellules T et les rendent anergiques grâce à des molécules co-inhibitrices, notamment l'antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (CTLA-4) et le ligand de mort cellulaire programmée (PD-L1) (Barach *et al.*, 2011). Les cellules T anergiques sont incapables de produire des cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN- γ . Par conséquent, l'activation autocrine et paracrine des cellules CD4 + et d'autres cellules immunitaires, y compris les cellules B, les macrophages et les cellules CD8 +, est bloquée, conduisant à une suppression supplémentaire de la cascade immunitaire (Freeman *et al.*, 2000). De plus, les tumeurs expriment également des Fas ligands conduisant à une apoptose lymphocytaire. Ils suppriment, non seulement, les cellules CD4+ et CD8+, mais favorisent également le phénotype suppresseur des lymphocytes T tels que les cellules régulatrices T CD25+ Foxp3+. Ces cellules sécrètent l'IL-10, le TGF- β et le VEGF responsables de la suppression de la réponse antitumorale et favorisant l'angiogenèse tumorale (Facciabene *et al.*, 2012). En outre, les tumeurs inhibent également la réponse immunitaire innée par induction de défauts quantitatifs et qualitatifs dans les cellules NK, les macrophages et les neutrophiles. Les cellules NK se sont avérées présenter une potentialité cytotoxique réduite en raison de la présence de facteurs sécrétés par les tumeurs, y compris le TGF- β dans le microenvironnement tumoral. Le TGF- β ainsi que d'autres cytokines (IL-4, IL-13, etc.) favorisent l'accumulation de macrophages M2, qui participent également à la génération d'un microenvironnement immunosuppresseur (Hao *et al.*, 2012; Mamessier *et al.*, 2011). D'autres mécanismes tels que la glycolyse anaérobie, l'hypoxie et l'acidité dans le microenvironnement tumoral ainsi que les anomalies existantes dans le métabolisme du tryptophane induits par une forte expression d'IDO diminuent davantage l'immunité antitumorale, entraînant ainsi une progression du cancer et favorisant les métastases (Barsoum *et al.*, 2011; Bellone *et al.*, 2013; Uyttenhove *et al.*, 2003).

Une autre stratégie adoptée par les cellules tumorales est la modulation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), en les rendant incapables de présenter efficacement les antigènes. Les CPA sont soit supprimées, soit fonctionnellement compromises en réponse aux facteurs sécrétés par les cellules malignes. La co-inhibition induite par la tumeur du deuxième signal de la présentation de l'antigène et l'immunosuppression qui en résulte sont désormais reconnues dans plusieurs types de cancer. Par ailleurs, les tumeurs altèrent les molécules du CMH, en particulier le CMH de classe I et d'autres composants de la machinerie de traitement de l'antigène dans les CPA, de manière à empêcher davantage la présentation de ses antigènes au système immunitaire.

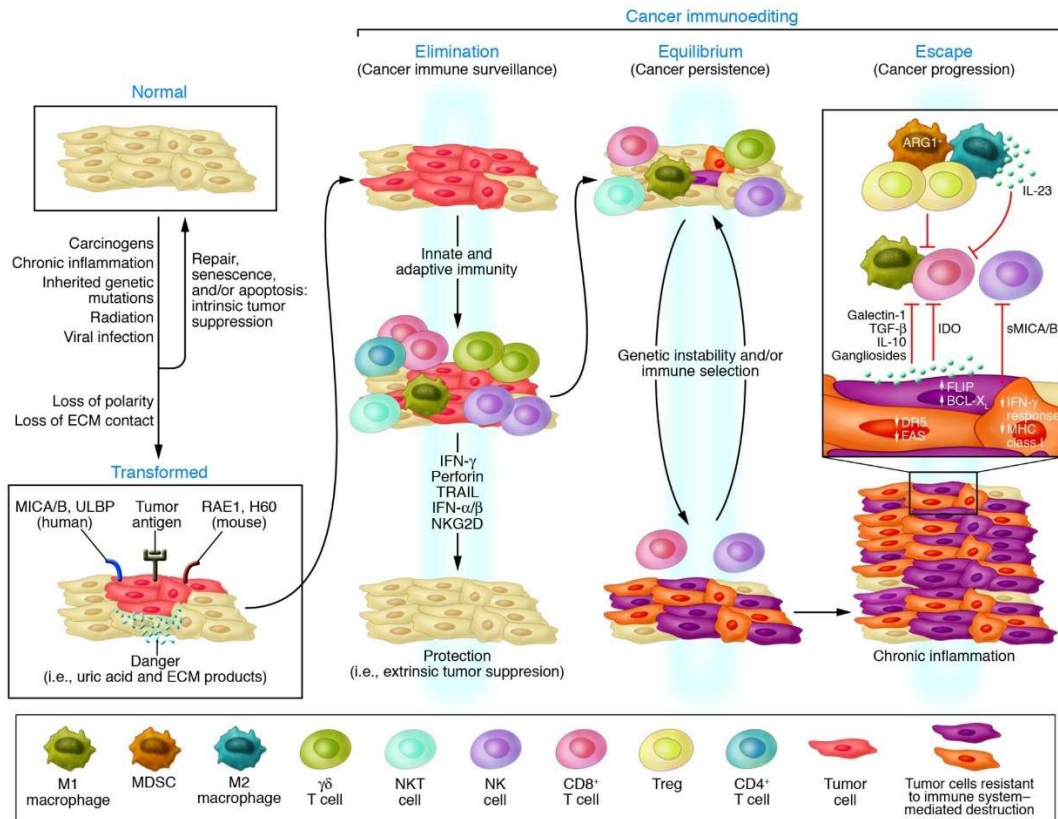


Figure 1.2. Immunoédition du cancer : La théorie des 3E (Swann and Smyth, 2007)

1.1.3.5 Le microenvironnement tumoral et l'immunoédition des cancers

Le microenvironnement tumoral joue un rôle essentiel dans la détermination du comportement du cancer. Il est composé de cellules tumorales et immunitaires et de divers facteurs sécrétés. C'est un système dynamique qui passe de la protection de l'hôte à la protection des tumeurs au cours des différentes phases du processus d'immunoédition du cancer. Pendant la phase d'élimination, le microenvironnement tumoral comprend des facteurs tels que l'IFN- γ , l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-7 qui favorisent l'immunité antitumorale, suppriment le recrutement des cellules suppressives et inhibent l'angiogenèse tumorale. Pendant la phase d'équilibre, le microenvironnement tumoral assure le rôle d'une niche, cachant des cellules cancéreuses relativement dormantes et permettant à ces cellules de subsister sans progression en maintenant un équilibre entre la cytotase et la cytolysse. Pendant la phase d'échappement, le lit tumoral est rempli de facteurs et de cellules qui favorisent la suppression immunitaire. Des facteurs comme l'IL-6, le TGF- β , l'IL-8 et l'IL-10 contribuent à la subversion généralisée de la réponse immunitaire anticancéreuse. En outre, les cellules tumorales induisent une régulation négative des cytokines antitumorales, y compris l'IL-12 et l'IFN- γ (Bhatia and Kumar, 2015).

1.2 Rôle des cellules NK dans l'immunité antitumorale

1.2.1 Généralités

Dans les années 1970, les travaux de Kiessling et Herbermann ont permis d'identifier une nouvelle population de cellules lymphocytaires, initialement décrites comme de grands lymphocytes granulaires (LGL), capables de lyser « naturellement » les cellules cancéreuses sans exposition préalable (Herberman *et al.*, 1975; Kiessling *et al.*, 1975a). Cette propriété, qui leur a valu l'appellation de cellules « natural killer » (NK), leur permet de jouer un rôle crucial dans l'immunité innée (Mandal and Viswanathan, 2015) et les distingue des lymphocytes T CD8 dont la cytotoxicité est spécifique à un épitope donné et nécessite une phase de différenciation (Kiessling *et al.*, 1975b). Elles n'expriment pas les marqueurs phénotypiques des lymphocytes B (CD19-) et T (CD3-) mais expriment le CD56, l'isoforme de la molécule d'adhésion des cellules neurales (NCAM) de 140 kDa, trouvée sur une minorité de cellules T et représentant l'unique signature d'identité des cellules NK de l'homme (Choucair *et al.*, 2019).

Chez l'homme, l'activité des cellules NK a d'abord été observée dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) (Pross and Jondal, 1975), cependant, on peut les retrouver dans plusieurs tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, notamment la moelle osseuse, la rate, les ganglions lymphatiques, le thymus, les amygdales, le foie, la peau, l'utérus pendant la gestation et les tissus muqueux, y compris les poumons, les petits et gros intestins et le côlon (Carrega and Ferlazzo, 2012). De plus, leur activation favorise leur migration vers les sites d'inflammation par chimioattraction (Zamai *et al.*, 2007).

Avec une demi-vie estimée à environ 7 à 10 jours en circulation, les cellules NK représentent 10 à 15% de la population totale des PBMC (Campbell and Hasegawa, 2013) et constituent la troisième plus grande population de lymphocytes après les cellules B et T (Mandal and Viswanathan, 2015). Il y a près d'une décennie, les cellules NK étaient reconnues comme faisant partie du premier groupe de la famille des cellules lymphoïdes innées (ILC1) (Chiossone *et al.*, 2018) mais récemment, la famille des ILC a été reclassée en 5 sous-ensembles en fonction de leur développement à partir des progéniteurs lymphoïdes communs et de leurs fonctions immunitaires. Dans ces sous-ensembles, les cellules NK ne sont plus regroupées avec les ILC1 (Vacca *et al.*, 2019).

Depuis leur découverte, les données sur les fonctions des cellules NK humaines ont connu une croissance exponentielle. Autrefois considérées comme des précurseurs du système immunitaire adaptatif, il est maintenant clair que les cellules NK sont des acteurs sophistiqués

du système immunitaire inné avec certaines caractéristiques de reconnaissance (Caligiuri, 2008). Elles jouent un rôle inestimable dans la surveillance immunitaire contre le cancer et l'élimination précoce des tumeurs (Robertson and Ritz, 1990). Cette fonction est assurée par un équilibre entre un certain nombre de récepteurs activateurs et inhibiteurs, induisant la libération des granules cytoplasmiques contenant des perforines et des granzymes et par conséquent la lyse de la cellule cible (Chambers *et al.*, 2018). D'autre part, les cellules opsonisées par les IgG peuvent aussi être reconnues par les cellules NK, par l'intermédiaire du récepteur FcγRIIIa/CD16a, induisant une dégranulation par le mécanisme d'ADCC. De plus, les cellules NK sont capables de produire une gamme de médiateurs solubles immunorégulateurs, ce qui leur permet de réguler la réponse immunitaire (Wu *et al.*, 2017). Elles se retrouvent ainsi à l'interface entre le système immunitaire inné et adaptatif (Moretta *et al.*, 2005). Par ailleurs, bien que les lymphocytes NK aient une aptitude à lyser spontanément les cellules tumorales ou infectées, Elles sont également capables 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 (Andersson and Cuijpers, 2009; Anfossi *et al.*, 2006).

1.2.2 Les sous populations des cellules NK

La population totale de cellules NK humaines CD3⁻ CD56⁺ NKp46⁺ est phénotypiquement et fonctionnellement hétérogène (Caligiuri, 2008). En effet, l'intensité de l'expression du CD56 ainsi que la présence ou l'absence de CD16 suggèrent des différences fonctionnelles en termes des niveaux de cytotoxicité et de production des cytokines (Farag *et al.*, 2002). Les cellules NK sont en outre divisées en deux sous-ensembles principaux sur la base de l'expression de CD56 et CD16: CD56^{bright}CD16[±] et CD56^{dim}CD16^{bright(+)} (Nagler *et al.*, 1989) (Figure 1.3). Ces sous-ensembles diffèrent dans la distribution tissulaire et dépendent du homing et de la maturation in situ (Chambers *et al.*, 2018).

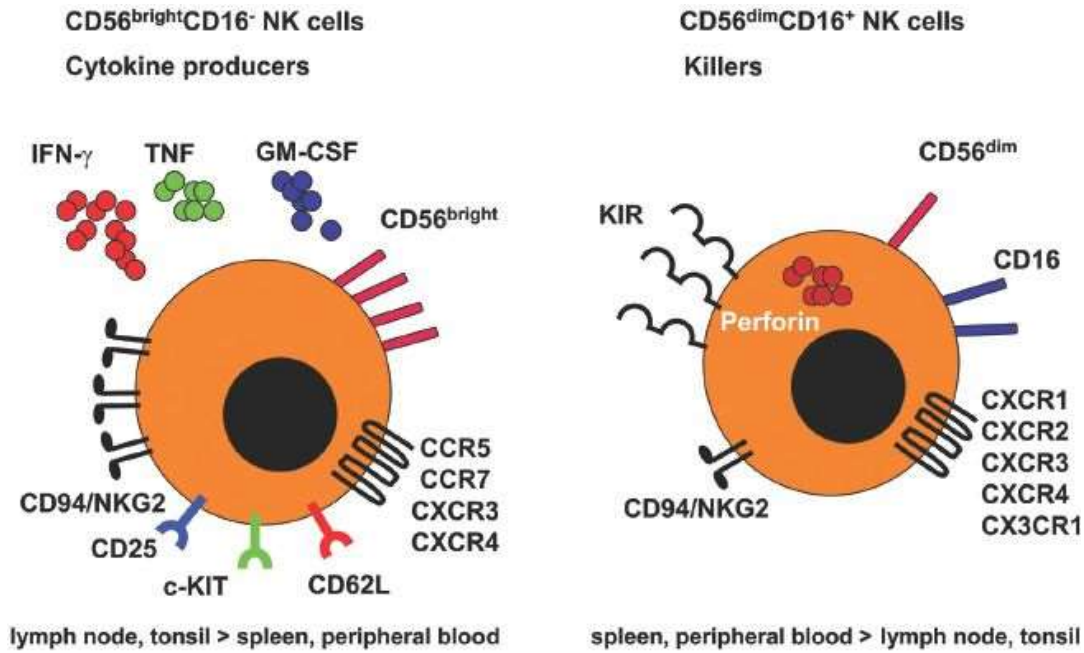


Figure 1.3. Phénotype des cellules NK (Lünemann *et al.*, 2009)

Environ 10% des cellules NK présentes dans le sang périphérique et près de 100% des cellules NK des tissus lymphoïdes secondaires ont une expression élevée de CD56 et expriment en parallèle très peu ou pas de CD16 (30–50% des cellules CD56^{bright} sont CD16⁻) (Farag *et al.*, 2002). Ces cellules ont été décrites comme un sous ensemble de cellules NK immatures et sensibles aux cytokines (Zamai *et al.*, 2007), avec une réponse cytolytique limitée (Choucair *et al.*, 2019). Elles ont surtout une activité immunorégulatrice via la production de nombreuses cytokines : IFN- γ , TNF- α , TNF- β , GM-CSF, IL-10, et IL-13 en réponse à des monokines (IL-12 et IL-15) produites par des macrophages activés (Fauriat *et al.*, 2010) et peuvent produire des cytokines et des chimiokines dans les minutes qui suivent leur activation (Megan A. Cooper *et al.*, 2001).

En revanche, les cellules NK avec une faible expression de CD56 (CD56^{dim}), sont complètement matures et constituent 90% des cellules NK du sang périphérique. La fonction principale de cette sous population est la cytotoxicité (Choucair *et al.*, 2019), tandis que leur capacité à produire des cytokines immunorégulatrices est relativement inférieure (Walzer *et al.*, 2007). Les cellules NK CD56^{dim} expriment également en abondance le CD16, qui peut se lier à la région constante (Fc) des immunoglobulines immobilisées sur une surface cellulaire. Cette liaison récepteur-ligand est suivie d'un signal d'activation médié par CD16 qui se traduit par une dégranulation des cellules NK et une lyse des cellules cibles dépendante de la perforine appelée cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Aribi, 2017).

D'autres populations de cellules NK dans le sang périphérique ont également été décrites. Les cellules $CD56^{dim}CD16^{-}$ et $CD56^{-}CD16^{+}$ sont peu fréquentes et leur fonction n'est pas bien connue (Goyos *et al.*, 2019). Par ailleurs, les cellules NK résidentes dans les tissus expriment le CD69, qui n'est pas exprimé par les cellules NK circulantes. Elles diffèrent également dans l'expression des récepteurs de chimiokines et des molécules d'adhésion: les cellules NK résidentes dans les tissus ont tendance à exprimer le CXCR6 et le CCR5 et les intégrines CD49a et CD103, tandis que les cellules NK dérivées du sang expriment les CXCR3, CXCR4, CCR7, CD62L (L-sélectine), et manquent de CD49a (Chambers *et al.*, 2018).

1.2.3 Développement et maturation des cellules NK

Il est généralement admis que les cellules NK se développent principalement dans la moelle osseuse, comme les cellules B et les cellules d'origine myéloïde. Cependant, des études récentes ont montré que leur maturation se produit également dans les tissus lymphoïdes secondaires, y compris les amygdales, les ganglions lymphatiques, la rate et le foie (Scoville *et al.*, 2017), et contrairement aux cellules T, leur maturation est indépendante du thymus (Renoux *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2013). Les cellules NK humaines dérivent de progéniteurs hématopoïétiques multipotents $CD34^{+}$ (Yokoyama *et al.*, 2004). Un progéniteur lymphoïde commun émerge de ces cellules, et se développe en précurseur de cellule NK. Les précurseurs de cellules NK sont incapables de se différencier en cellules T, B, myéloïdes ou érythroïdes, mais sont stimulées pour former des cellules NK matures (Rosmaraki *et al.*, 2001). Cependant, les thymocytes $CD4^{-}CD8^{-}$ en stade précoce peuvent se différencier en cellules NK (Di Santo, 2006).

Chez l'homme, le développement des cellule NK peut être résumé en cinq étapes distinctes (pro-NK, pré-NK, iNK immature, NK $CD56^{bright}$ et NK $CD56^{dim}$) en fonction des changements du phénotype de la surface cellulaire (niveaux d'expression des CD34, CD117, CD56 et CD94) et la fonction cellulaire (Briercheck *et al.*, 2010) (Figure 1.4). Les cellules précurseurs des cellules NK (NKp) se différencient en cellules NK immatures $CD3^{-}CD56^{bright}CD16^{-}$ (iNK) capables de produire des cytokines, telles que l'IFN- γ et le TNF- α , lors de l'activation (Freud and Caligiuri, 2006). Leur maturation commence par l'expression de CD56 suivie d'une expression simultanée de CD94 / NKG2A. Les cellules $CD56^{bright}$ NK peuvent ensuite gagner en compétence fonctionnelle lors de la différenciation en cellules NK $CD56^{dim}CD16^{bright}$ matures. La maturation finale est donc en corrélation avec une diminution de l'expression de CD94 / NKG2A et le CD56 (Goyos *et al.*, 2019).

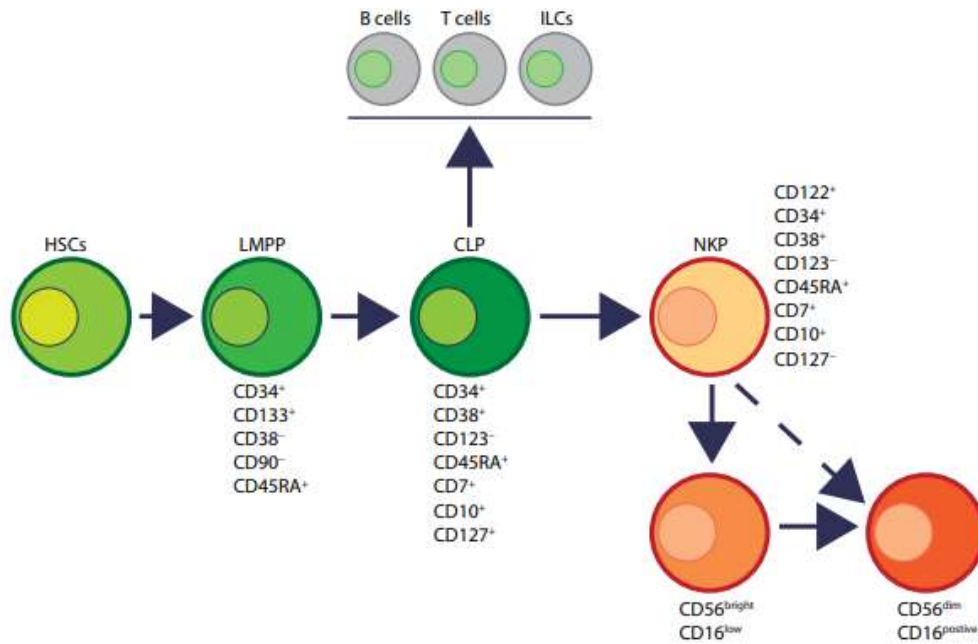


Figure 1.4. Développement des cellules NK chez l’homme (Abel *et al.*, 2018).

L'expression de CD56 s'accumule progressivement au niveau de la population à mesure que les cellules progressent du stade pré-NK au stade de maturation iNK. De plus, l'expression du CD56 est uniformément élevée au sein de la population de cellules NK CD56^{bright}. Bien que le CD56 soit généralement considéré comme un marqueur des cellules NK matures, le stade final de la maturation des cellules NK humaines est marqué par une diminution de l'expression des CD56 et CD94 et une augmentation du CD16 et des récepteurs analogues à l'immunoglobuline (KIR) (Freud and Caligiuri, 2006).

La maturation des cellules NK est régulée par Gata-3 et IRF-2 et la différenciation fonctionnelle des cellules NK matures implique CEBP- γ , MEF et MITF. Il a été également démontré que la cytokine IL-15 est essentielle au développement, à l'homéostasie et à la survie des cellules NK (Briercheck *et al.*, 2010), tandis que, l'IL-2 dérivée des cellules T joue un rôle essentiel dans la maturation fonctionnelle cytolytique des cellules NK (Mandal and Viswanathan, 2015).

L'éducation des cellules NK représente l'acquisition complète de la compétence fonctionnelle associée à la transition vers le phénotype CD56^{dim}. Une cellule NK commence ainsi à acquérir des compétences fonctionnelles lorsqu'elle reçoit un signal inhibiteur délivré via deux types de récepteurs inhibiteurs; le récepteur NKG2A conservé, ou les récepteurs variables (KIR chez l'homme), spécifiques à l'espèce (Goyos *et al.*, 2019). Par ailleurs, la reconnaissance des molécules de CMH de classe I par le récepteur inhibiteur des cellules NK est l'événement le plus important qui détermine si une cellule NK sera éduquée, et donc armée de fonctionnalités

effectrices, ou si elle sera hyposensible en termes de la cytotoxicité et de la sécrétion de cytokines après stimulation (Höglund and Brodin, 2010).

1.2.4 Fonctions des cellules NK

1.2.4.1 Fonctions effectrices

Les cellules NK assurent leurs fonctions grâce à deux mécanismes principaux qui sont des composants essentiels de la réponse immunitaire. Premièrement, les cellules NK sont des lymphocytes cytotoxiques qui peuvent directement lyser des cellules qui ont subi une transformation maligne ou qui ont été infectées par un virus ou un autre pathogène intracellulaire (Zhang and Huang, 2017). Cette fonction cytolytique peut s'initier à travers une variété de processus, y compris la dégranulation et la reconnaissance par des récepteurs de la mort, et est essentielle pour l'élimination des cellules pathologiques et dysfonctionnelles (Smyth *et al.*, 2005; Stabile *et al.*, 2017). Deuxièmement, les cellules NK peuvent produire une variété de cytokines en réponse à la stimulation des récepteurs d'activation ainsi qu'à la signalisation d'activation induite par les cytokines inflammatoires (Fauriat *et al.*, 2010; Freeman *et al.*, 2015)

Les mécanismes moléculaires qui régulent la cytotoxicité des cellules NK ont été bien décrits et peuvent être divisés en trois principaux processus : (i) reconnaissance des cellules cibles, (ii) contact avec les cellules cibles et formation de synapse immunologique (IS), et (iii) induction de la mort des cellules cibles (Abel *et al.*, 2018). La cytotoxicité des cellules NK est étroitement régulée par un équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs. Les récepteurs inhibiteurs des cellules NK reconnaissent la molécule de CMH de classe I et empêchent l'activation des cellules NK (Figure 1.5). Ce qui explique l'auto-tolérance et la prévention de la destruction des cellules hôtes. Ces récepteurs incluent les récepteurs inhibiteurs KIR et CD94-NKG2A qui se lient aux CMH de classe I (Mandal and Viswanathan, 2015). Par ailleurs, les cellules NK peuvent être activées lorsqu'elles rencontrent des cellules dépourvues de molécule de CMH de classe I (hypothèse du «soi manquant») car les cellules infectées et les cellules tumorales régulent souvent à la baisse l'expression du CMH de classe I pour échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). D'autre part, le stress cellulaire associé à l'infection ou à la croissance du cancer, tels que les réponses aux dommages de l'ADN et l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, induit de puissants signaux de stimulation, ce qui fait pencher la balance en faveur de l'activation des cellules NK (Bauer *et al.*, 1999; Malnati *et al.*, 1993) (Figure 1.5). Une fois reconnues, les cellules NK interagissent directement avec la cellule cible

par la formation d'une synapse immunologique lytique qui facilite la mort des cellules cibles grâce à deux mécanismes essentiels (Abel *et al.*, 2018).

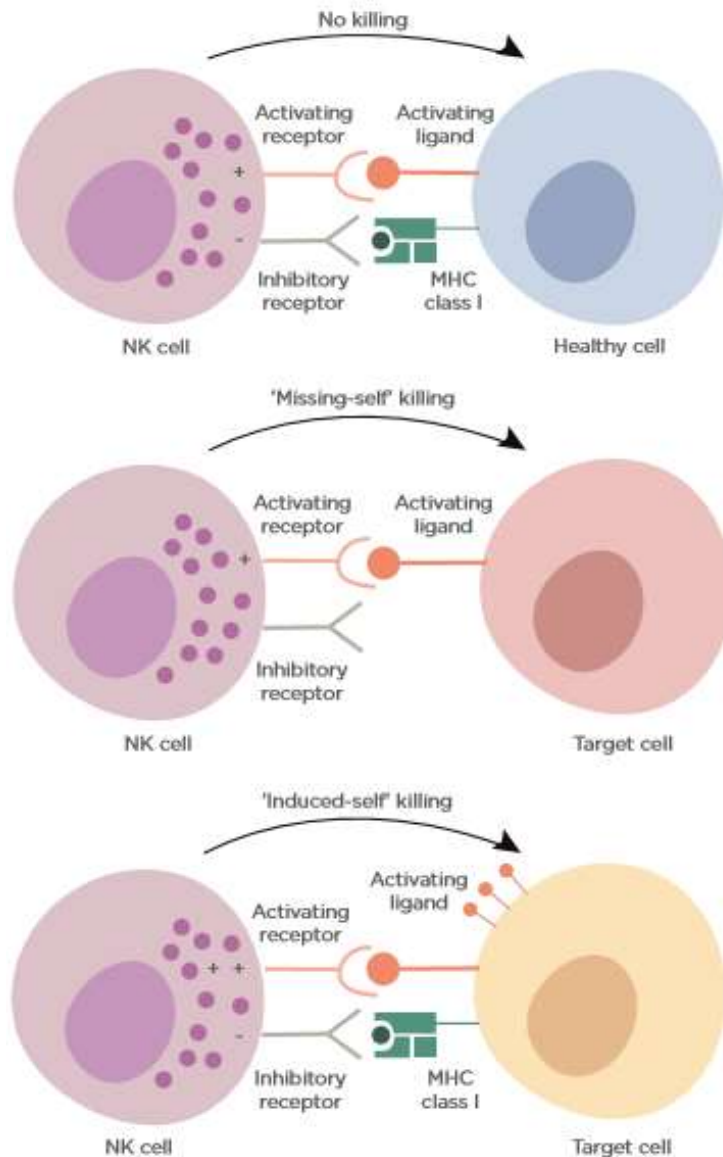


Figure 1.5. Activation des cellules NK (Sharrock, 2019)

Le mécanisme principal de la cytotoxicité médiée par les cellules NK implique la libération de molécules lytiques dirigées vers la cellule cible (Tam *et al.*, 2003). Les cellules NK stockent ces molécules dans des granules cytolitiques qui sont livrées à la cellule cible après leur fusion avec la membrane au niveau de la synapse immunologique (Lee *et al.*, 2010). Ce processus nécessite des événements de réorganisation du cytosquelette, ainsi que la polarisation des microtubules vers la cellule cible (Li *et al.*, 2018; Spanholtz *et al.*, 2011). Les granules lytiques polarisés voyagent le long des microtubules et, une fois au niveau de la synapse

immunologique, fusionnent avec la membrane cellulaire cible et libèrent des enzymes qui facilitent cette activation d'apoptose intrinsèque au sein de la cellule cible (Denman *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010). L'expression à la surface cellulaire de la protéine membranaire associée aux lysosomes 1 (LAMP1; également connue sous le nom de CD107a) est considérée comme marqueur de ce processus, appelé «dégranulation» (Betts *et al.*, 2003).

Les granules lytiques sont des organites apparentés aux lysosomes qui contiennent les principaux effecteurs de la cytotoxicité comprenant la perforine, une glycoprotéine de 60 à 70 kDa, qui s'insère dans la membrane plasmique des cellules cibles et forme des pores menant à la lyse osmotique et les granzymes, une classe de sérine protéases, qui passent à travers les pores et activent les caspases, provoquant l'apoptose de cellules cibles (Shimasaki *et al.*, 2020). Une fois à l'intérieur de la cellule cible, le granzyme B peut déclencher l'apoptose par des mécanismes indépendants et dépendants de la caspase. Le granzyme B active l'apoptose dépendante de la caspase en plusieurs points de la voie apoptotique en clivant directement l'initiateur apoptotique caspase-8 ainsi que la caspase-3 (Abel *et al.*, 2018). Le granzyme B peut également induire l'apoptose d'une manière indépendante de la caspase et induire la libération du cytochrome C des mitochondries par le clivage protéolytique de la protéine pro-apoptotique, Bid (Pinkoski *et al.*, 2001). Remarquablement, la libération d'un seul granule peut être suffisante pour tuer une cellule cible, et après dégranulation, les cellules NK peuvent tuer d'autres cellules cibles par un processus similaire (Gwalani and Orange, 2018).

La destruction directe peut également se produire via une apoptose dépendante des caspases impliquant l'activation des récepteurs de la mort, présents à la surface de la cellule cible. Ces récepteurs incluent les récepteurs TRAIL-R et Fas/CD95 qui sont activés par leurs ligands apparentés TRAIL, FasL et CD95L, présents sur les cellules NK (Khosravi-Far, 2004; Smyth *et al.*, 2005). L'expression de surface des récepteurs de la mort peut être induite sur les cellules cibles par l'IFN- γ dérivé des cellules NK, et leur activation initie de nombreux programmes de signalisation pro-apoptotiques (Screpanti *et al.*, 2001). La superfamille des récepteurs de la mort se caractérise par l'utilisation d'un domaine de la mort cytoplasmique qui permet à ces récepteurs d'activer la machinerie apoptotique, y compris les caspases 8 et 10 (Guicciardi and Gores, 2009). Ces caspases initiatrices favorisent une cascade de protéases et induisent des dommages mitochondriaux et la libération du cytochrome C entraînant la formation de l'apoptosome (Crowder and El-Deiry, 2012).

La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) peut également être un mécanisme de destruction des cellules tumorales par les cellules NK car elles expriment le Fc γ RIII (CD16) qui est un récepteur Fc de faible affinité pour les IgG (Mandal and Viswanathan, 2015).

Outre leur capacité cytotoxique, les cellules NK peuvent sécréter plusieurs cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, et par conséquent, influencer l'activité d'autres cellules immunitaires. Ce sont de puissants producteurs de cytokines pro-inflammatoires et immunosuppressives. Cependant, la libération de cytokines inflammatoires est distincte de la sécrétion de granules cytotoxiques car les cellules NK utilisent des composants de signalisation induits par activation pour réguler ces deux fonctions de façon indépendante (Reefman *et al.*, 2010). Bien que les cellules NK puissent produire une large gamme de cytokines en fonction de l'environnement inflammatoire, elles produisent principalement des cytokines de type Th1 lorsqu'elles répondent aux ligands tumoraux et aux agents pathogènes intracellulaires (Vivier, 2011, pp. 44–49). Il s'agit notamment de l'IFN- γ , du TNF- α et du Facteur de stimulation des colonies des granulocytes et des macrophages (GM-CSF) qui facilitent l'activation des cellules T ainsi que d'autres médiateurs immunitaires innés tels que les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles (Van den Bosch *et al.*, 1995). L'IFN- γ est considéré comme la cytokine prototypique des cellules NK, et sa production est connue pour favoriser la polarisation des cellules Th1, activer les APC pour réguler davantage l'expression du CMH de classe I, activer la destruction des macrophages des agents pathogènes intracellulaires obligatoires et ont des effets antiprolifératifs sur les cellules transformées (Semino and Rubartelli, 2010).

Les cellules NK produisent également des cytokines chimiotactiques (chimiokines), dont CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), XCL1 (lymphotoxine) et CXCL8 (IL-8) qui peuvent attirer les lymphocytes effecteurs et les cellules myéloïdes vers les tissus enflammés (Walzer *et al.*, 2005).

1.2.4.2 Prolifération

Les cellules CD56^{dim}, expriment le récepteur IL2 d'affinité intermédiaire (IL2R $\beta\gamma$) et, en réponse à des doses élevées de traitement à l'IL2, présentent un faible taux d'expansion, mais exercent une forte cytotoxicité. Des concentrations élevées d'IL15 induisent également un signal via le récepteur de IL2R $\beta\gamma$ (Dusenbery *et al.*, 1994). Ainsi, l'IL2 ou l'IL15 seuls sont suffisants pour induire la prolifération des cellules NK mais leur effet peut être renforcé par d'autres cytokines ou stimulis. Notamment, la présence de cellules cibles améliore la prolifération des cellules NK induite par l'IL2 (Baume *et al.*, 1992). Diverses méthodes ont été

développées pour améliorer l'expansion, la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK dans la thérapie cellulaire anticancéreuse, tels que l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses du cordon ombilical irradiées (UC-MSC) (Boissel *et al.*, 2008), l'utilisation de la lignée cellulaire de leucémie K562 irradiée et même génétiquement modifiée (K562-mb15-41BBL)(Fujisaki *et al.*, 2009) et l'activation combinée via les récepteurs NKp46 et CD2 par des billes recouvertes d'anticorps (Miltenyi Biotec, Auburn CA).

1.2.4.3 Régulation

La plupart des fonctions des cellules NK sont analogues aux cellules TCD8⁺ ou Th1, y compris la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α et GM-CSF) et la médiation de la cytotoxicité contre les cellules infectées ou tumorales. Cependant, les travaux récents suggèrent que les cellules NK jouent également un rôle de régulation (Schuster *et al.*, 2016). En effet, les cellules NK assurent la médiation des fonctions régulatrices d'autres types cellulaires, y compris les cellules myéloïdes (les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages) ou lymphoïdes (lymphocytes T et lymphocytes B) via la production des cytokines ou par contact direct d'une manière dépendante des interactions récepteur-ligand (Abel *et al.*, 2018). Ces fonctions régulatrices médiées par les cellules NK devraient se produire pendant les infections virales, bactériennes ou protozoaires, les réponses immunitaires anti-tumorales, les résultats immuno-pathologiques inattendus et les maladies auto-immunes (Pallmer and Oxenius, 2016). Une fonction immunorégulatrice innée a été également proposée en raison de leur capacité inhérente à produire l'IL-10 et d'IL-13 (M. A. Cooper *et al.*, 2001).

1.2.4.4 Mémoire

La formation de cellules mémoire, spécifiques à l'antigène et dotées d'une longue durée de vie, a lieu après la rencontre initiale avec l'antigène et est considérée comme une qualité de lymphocytes adaptatifs exprimant des récepteurs recombinants spécifiques à l'antigène, c'est-à-dire les cellules B et T. Cependant, des données récentes ont fourni des preuves que, dans certaines conditions, les cellules NK peuvent présenter une mémoire d'activation préalable (O'Leary *et al.*, 2006).

1.2.5 Cellules NK et immunité anti-tumorale

1.2.5.1 Immunosurveillance

Les cellules NK jouent un rôle vital dans l'éradication des cellules tumorales en travaillant en collaboration avec les cellules cytotoxiques T CD8⁺ pour générer une réponse immunitaire efficace (Figure 1.6). Cependant, les tumeurs régulent souvent à la baisse le MHC de classe I, ce qui les rend méconnaissables aux lymphocytes T cytotoxiques, entraînant une incapacité à initier des fonctions de la réponse immunitaire adaptative (Garcia-Lora *et al.*, 2003). L'absence d'expression du MHC I ou une régulation à la hausse des ligands NKG2D ou CD70 (le ligand du CD27) peut toujours rendre les cellules tumorales sensibles à la lyse induite par les cellules NK (Vivier *et al.*, 2008). En effet, de nombreuses études l'ont montré *in vivo* en implantant des cellules tumorales dans des souris dépourvues des fonctions des cellules NK ou en administrant des anticorps pour épuiser les cellules NK. Dans la plupart des cas, l'élimination des cellules NK chez ces souris a entraîné une croissance tumorale et des métastases plus agressives (Langers *et al.*, 2012).

Chez l'homme les observations associant la survenue d'une tumeur maligne et d'une immunodéficience primaire des cellules NK suggèrent également un rôle pour les cellules NK dans l'immunosurveillance tumorale. Une étude de 11 ans a montré qu'une faible activité cytotoxique des cellules NK était corrélée à un risque élevé de cancer. D'autre part la présence de cellules NK infiltrant les tumeurs représente un marqueur pronostique positif pour les tumeurs malignes, y compris le carcinome colorectal, le carcinome gastrique et le cancer du poumon à cellules squameuses et sont capables d'exercer une cytotoxicité contre un large éventail de tumeurs malignes (Shimasaki *et al.*, 2020). Bien que les cellules NK ne soient généralement pas la population lymphoïde prédominante dans les tumeurs, elles peuvent attirer l'infiltration des cellules T et provoquer des réponses inflammatoires par la sécrétion des cytokines et des chimiokines. En théorie, les cellules NK pourraient également contribuer à prévenir les métastases en éliminant les cellules tumorales circulantes (Malmberg *et al.*, 2017).

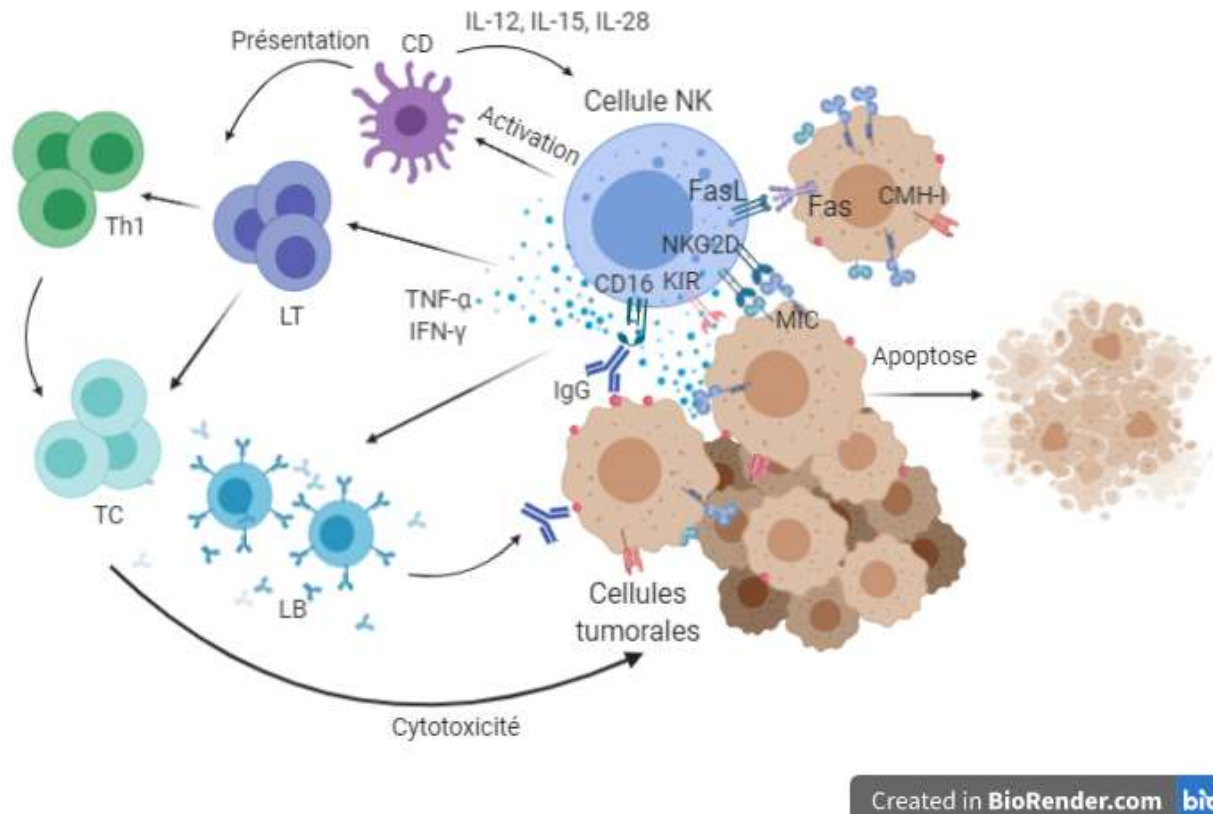


Figure 1.6. Rôle des cellules NK dans la surveillance immunitaire

1.2.5.2 Résistance tumorale aux cellules NK

Malgré leur puissante activité antitumorale, les cellules NK sont confrontées à des défis importants qui entravent leur efficacité. De nombreux mécanismes interviennent dans la suppression des cellules NK dans le microenvironnement tumoral (Figure 1.7), dont plusieurs contribuent également à atténuer les réponses des lymphocytes T (Hodgins *et al.*, 2019). En effet, les cellules cancéreuses sont capables d'échapper à la réponse immunitaire et aux cellules NK en utilisant un certain nombre de mécanismes. Celles-ci comprennent l'augmentation des molécules du MHC I pour inhiber l'activation des cellules NK, la diminution de l'expression du ligand NKG2D pour altérer la reconnaissance des cellules NK et la régulation à la hausse des niveaux de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10 et le TGF- β (Sungur and Murphy, 2014). D'autre part, l'IFN- γ sécrété par les cellules NK et les cellules T stimule également l'expression des molécules du CMH de classe I dans les cellules tumorales et peut supprimer l'activité des cellules NK grâce à leur reconnaissance par des récepteurs inhibiteurs. De plus, PD-1, CTLA4, la protéine du gène d'activation des lymphocytes 3 (LAG3) et le récepteur cellulaire du virus de l'hépatite A (HAVCR2; également connu sous le nom de TIM3) sont exprimés dans certaines cellules NK, et leurs ligands peuvent jouer un rôle dans l'atténuation

des réponses antitumorales à cellules NK. D'ailleurs, le blocage de cette interaction avec les inhibiteurs de point de contrôle améliore l'activité des cellules NK (Shimasaki *et al.*, 2020).

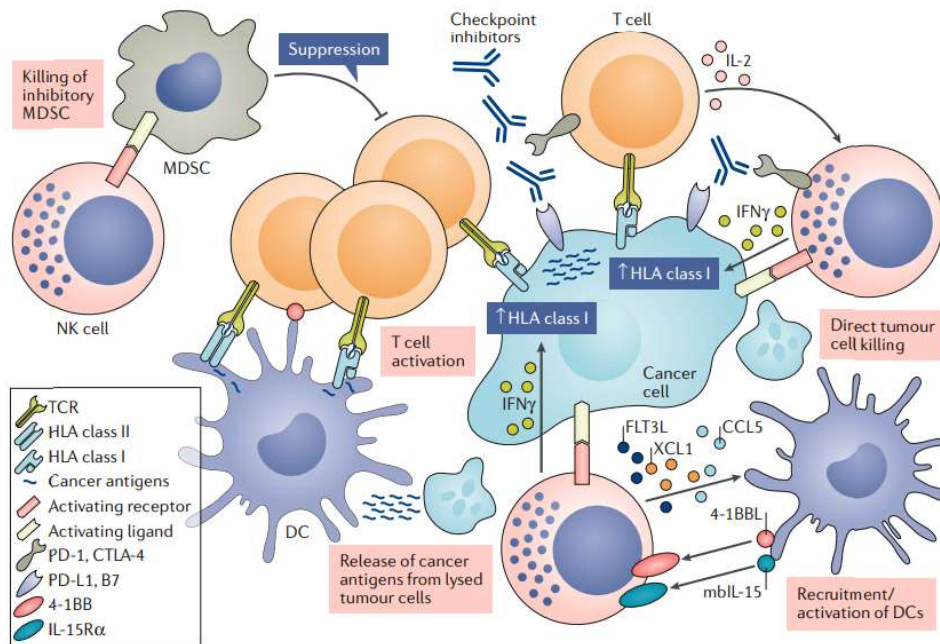


Figure 1.7. Interaction entre les cellules NK et d'autres cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral (Shimasaki *et al.*, 2020).

1.2.6 Immunothérapie à cellules NK

1.2.6.1 Les cellules NK dans les traitements conventionnels du cancer

Les cellules NK jouent un rôle fondamental dans les traitements traditionnels du cancer. Les stratégies anticancéreuses de longue date, la chimiothérapie et la radiothérapie, sont maintenant connues pour médier leurs effets, au moins partiellement, via le système immunitaire. La chimiothérapie et la radiothérapie induisent un stress cellulaire dans les cellules tumorales, conduisant à une régulation positive des ligands activant les cellules NK, à la libération des DAMP et à l'induction d'une mort cellulaire immunogène. En revanche, il est désormais clair que la chirurgie compromet les fonctions des cellules NK, offrant une opportunité de propagation et de croissance tumorales (Hodgins *et al.*, 2019).

1.2.6.2 Thérapie cellulaire adoptive

Les cellules NK autologues ont été explorées pour l'immunothérapie anticancéreuse, bien que ce domaine soit moins avancé par rapport au transfert de cellules T autologues. Même si les cellules NK peuvent être isolées et expansées en *ex vivo* à partir du sang périphérique des patients, l'expansion des cellules NK s'est avérée plus gênante que l'expansion des cellules T. Plusieurs approches sont à l'étude pour surmonter les problèmes rencontrés avec l'état fonctionnel et l'expansion des cellules NK autologues qui sont souvent non satisfaisants (Geller *et al.*, 2011). Différentes combinaisons de cytokines activatrices (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18) ont été utilisées pour fournir des facteurs importants pendant l'expansion en *ex vivo* (Guillerey *et al.*, 2016). Étant donné les difficultés de se procurer un nombre abondant de cellules NK cytotoxiques à partir du sang périphérique, des stratégies supplémentaires ont été étudiées pour fournir des banques de cellules NK facilement disponibles pour les patients (Tonn *et al.*, 2013, p. 92).

Des efforts récents pour améliorer l'efficacité clinique de l'immunothérapie à cellules NK ont conduit au développement de cellules NK génétiquement modifiées qui expriment un récepteur d'antigène chimérique (CAR). Les cellules NK primaires et les lignées cellulaires NK peuvent être conçues pour exprimer des CAR qui redirigent la spécificité anti-tumorale des cellules NK sur une base dépendante des antigènes (Abel *et al.*, 2018). Grâce à la manipulation des motifs de signalisation essentiels à l'activation des lymphocytes, les CAR sont également conçues pour utiliser des molécules de signalisation intracellulaires spécifiques qui peuvent affiner davantage la fonction des cellules NK et optimiser leur potentiel thérapeutique (Sadelain *et al.*, 2013). Fait intéressant, l'utilisation d'une lignée cellulaire clonale dérivée d'une leucémie à cellules NK

humaines, connue sous le nom de NK-92, a été génétiquement modifiée pour exprimer des CAR entièrement fonctionnelles et ces cellules se sont révélées très prometteuses en ce qui concerne leur innocuité et leur efficacité lors des essais cliniques récents (Abel *et al.*, 2018).

1.2.6.3 Thérapie par cytokines

L'inconvénient majeur d'une approche de transfert adoptif est le coût élevé et l'expertise nécessaires pour fabriquer de grandes quantités de cellules immunitaires de qualité clinique (Pettitt *et al.*, 2018). Pour cette raison, les thérapies standard ont attiré beaucoup de recherches et d'investissements. Les cytokines, en tant que régulateurs critiques des cellules NK, sont un choix attrayant pour les immunothérapies contre le cancer, en particulier à la lumière des résultats montrant que les cellules NK dépendent fortement de l'IFN de type I pour initier une réponse anticancéreuse (Marcus *et al.*, 2018).

Le traitement à l'IL-2 a montré une efficacité clinique limitée avec une toxicité alarmante. Des travaux plus récents se concentrent sur l'utilisation de cytokines modifiées et de thérapies combinées. Par exemple, le traitement des cellules NK avec IL-12, IL-18 ou la cytokine IL-2 modifiée appelée «super-2» qui a augmenté l'activité antitumorale des cellules NK dans un modèle de cancer de souris. Aussi, la cytokine IL-15 ALT-803 modifiée a montré des résultats précliniques impressionnants, en partie en raison de sa capacité à activer efficacement les cellules NK (Hodgins *et al.*, 2019).

1.2.6.4 BiKEs / TriKEs

La thérapie par anticorps a l'avantage attrayant d'être une approche standard pour activer les cellules NK *in vivo*. En plus des approches traditionnelles qui s'appuient sur des anticorps monoclonaux se liant aux tumeurs pour activer les cellules NK via ADCC (Guillerey *et al.*, 2016), plus récemment, les agents de mobilisation des cellules tueuses bispécifiques (BiKE) ont donné de grandes promesses. Les BiKE sont de petites molécules constituées de deux fragments variables à chaîne unique (scFv) de spécificité différente complexées ensemble par des liaisons flexibles. Un scFv cible un antigène tumoral (par exemple, CD19, CD20, CD33), tandis que l'autre est spécifique au récepteur CD16. Cela rassemble efficacement les cellules cancéreuses et NK, facilitant la formation d'une synapse immunologique et permettant aux cellules NK d'exécuter spécifiquement et efficacement leurs fonctions cytolytiques sans costimulation supplémentaire (Felices *et al.*, 2016).

1.2.6.5 Inhibiteurs des points de contrôle

Les récepteurs immunitaires aux points de contrôle sont un groupe de récepteurs inhibiteurs qui atténuent les fonctions effectrices des cellules immunitaires. Physiologiquement, les récepteurs des points de contrôle immunitaire sont essentiels pour prévenir l'auto-immunité et l'immunopathologie, mais le cancer les exploite souvent pour renverser l'immunité antitumorale. Notamment, les cellules NK expriment de nombreux récepteurs aux points de contrôle, dont certains ont été ciblés par l'immunothérapie anticancéreuse. Plusieurs régulateurs négatifs des fonctions des cellules NK ont été identifiés par des recherches précliniques, y compris les récepteurs KIR, CD94 / NKG2A, CTLA-4 et PD-1, TIGIT, LAG3, TIM-3 (Hodgins *et al.*, 2019). L'inhibition de certains récepteurs des points de contrôle à la surface des cellules NK a montré le potentiel d'inverser le dysfonctionnement des cellules NK dans les tumeurs et de renforcer l'immunité anti-tumorale, à la fois dans les essais cliniques (anti-KIR et anti-NKG2A), et dans les études précliniques (anti-TIGIT par exemple) (Jiacheng Bi et Zhigang, 2019).

1.3 Erythrocytes : Physiologie, récepteurs et signalisation cellulaire

1.3.1 Généralités

Les érythrocytes sont le type de cellules le plus abondant dans le corps humain, comptant entre 20 et 30 trillions et représentant près de 70% du nombre total de cellules chez l'adulte (c.-à-d. $5\,200\,000 \pm 300\,000$ cellules / mm³ de sang chez un homme en bonne santé) (Anderson *et al.*, 2018; Hamidi and Tajerzadeh, 2003). Ce sont des cellules hautement différenciées qui ont perdu tous les organites et la plupart des mécanismes intracellulaires au cours de leur processus de maturation (Pretini *et al.*, 2019). La fonction principale associée aux érythrocytes est le transport de l'oxygène vers tous les tissus et toutes les cellules du corps et de la livraison de dioxyde de carbone aux poumons. En plus de cette fonction d'échange de gaz, ils jouent également un rôle dans l'homéostasie et la protection contre les dommages oxydatifs (Morera and MacKenzie, 2011). Avec leur structure flexible, les érythrocytes sont capables de se déformer afin de traverser tous les vaisseaux sanguins, y compris les très petits capillaires. Tout au long de leur vie, de durée moyenne de 120 jours, les érythrocytes humains voyagent dans la circulation sanguine et entrent en contact avec un large éventail de différents types de cellules. En fait, les érythrocytes sont capables d'interagir et de communiquer avec les cellules endothéliales (CE), les plaquettes, les macrophages et de nombreuses autres cellules impliquées dans la réponse immunitaire. De plus, ils sont impliqués dans le maintien de la thrombose et de l'hémostase et jouent un rôle important dans la réponse immunitaire (Pretini *et al.*, 2019).

1.3.2 Développement des érythrocytes

La maturation des érythrocytes à partir des cellules progénitrices se produit majoritairement dans la moelle osseuse, y compris l'élimination du noyau. Environ 2,5 millions de globules rouges immatures sont libérés de la moelle osseuse chaque seconde, afin de maintenir le nombre total d'érythrocytes dans la circulation (Antunes *et al.*, 2011). Ces globules rouges immatures sont appelés réticulocytes et représentent environ 1% des globules rouges circulants (Bøyum, 1976). Bien que les réticulocytes manquent de noyau, lorsqu'ils sont libérés de la moelle osseuse, ils n'ont pas encore perdu leurs organites et ont donc la capacité de traduire les protéines. Le processus de maturation des réticulocytes en globules rouges matures prend environ 2 jours (Figure 1.8), et comprend l'élimination de tous les organites et la restructuration de la membrane cellulaire en forme biconcave classique (Greenwalt *et al.*, 1962; Neuman *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015, p. 33). Les mitochondries de ces cellules sont éliminées par une combinaison de dégradation enzymatique et d'excrétion cellulaire dans les vacuoles (Ruddell *et*

al., 1998; Sionov *et al.*, 2015). Ce processus effectue aussi une sélection, une ségrégation et une déplétion des protéines membranaires. En revanche, d'autres protéines membranaires pertinentes sont augmentées pendant la maturation des globules rouges, par rapport aux réticulocytes, tels que band 3, la glycophorine C (GPC), la protéine rhésus (Rh), les glycoprotéines associées au Rh (RhAG), XK et GPA. Après maturation, les globules rouges acquièrent la remarquable capacité d'être déformables en réponse à des forces externes et utilisent cette capacité pour traverser les capillaires sanguins les plus étroits (Pretini *et al.*, 2019).

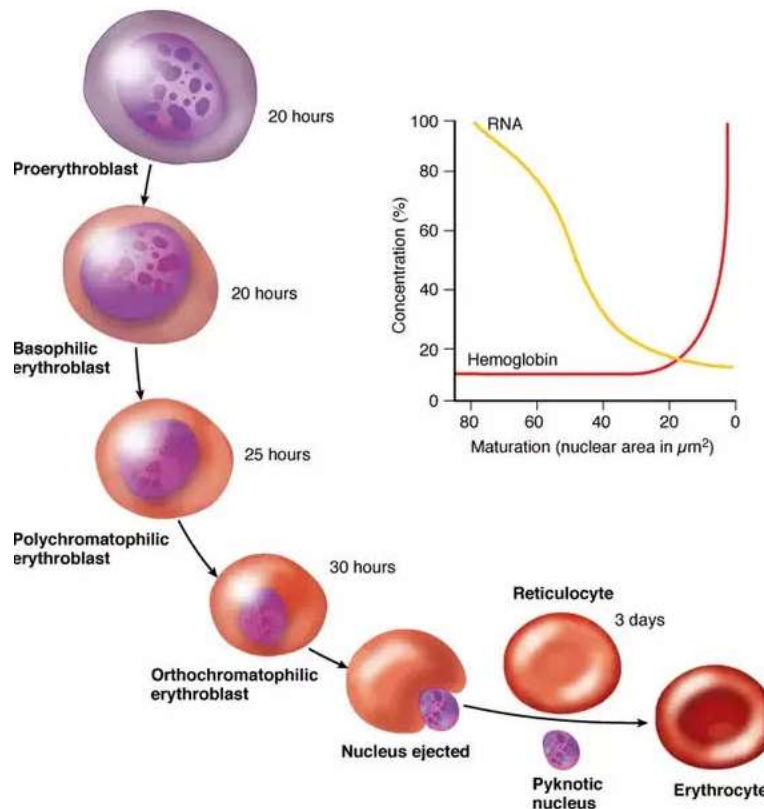


Figure 1.8. Maturation des érythrocytes

1.3.3 Structure et physiologie des érythrocytes

Les érythrocytes sont des disques biconcaves d'un diamètre moyen de 7,8 μm , d'une épaisseur de 2,5 μm environ, et un volume de 85 à 91 μm^3 . La forme du disque biconcave avec un rapport surface/volume élevé est essentielle pour la fonction d'échange de gaz des érythrocytes. Par ailleurs, cette forme a un degré élevé de flexibilité, requis pour le passage de ces cellules à travers les capillaires d'un diamètre de 3 à 4 μm (Hamidi and Tajerzadeh, 2003). En absence d'organites, le cytoplasme est en grande partie composé d'hémoglobine, d'un cytosquelette et d'un protéasome 20S. le cytosquelette conserve la forme classique biconcave de la cellule et le

protéasome est chargé d'une dégradation contrôlée des protéines indésirables ou oxydées endommagées (Li *et al.*, 2007, 2005).

Le caractère distinctif des érythrocytes peut être largement attribué à leur membrane cellulaire, la composante la plus compliquée des érythrocytes. Les membranes des globules rouges contiennent une proportion élevée d'enzymes associées à la membrane et présentent des antigènes spécifiques des groupes sanguins. En plus de ces caractéristiques uniques, ces membranes contiennent également de nombreux composants en commun avec les membranes des cellules nucléées, y compris les récepteurs de ligands et les canaux de transport transmembranaires (Barbosa *et al.*, 2015). Les érythrocytes sont également particulièrement sensibles aux changements osmotiques dans l'environnement et peuvent être facilement déshydratés ou lysés (Kim *et al.*, 2009).

Contrairement aux cytosquelettes de la plupart des cellules, le cytosquelette et la membrane plasmique sont extrêmement et étroitement liés pour créer une structure fondamentale et complexe appelée squelette membranaire. Ceci est essentiel pour la forme et la déformabilité réversible du RBC. Grâce au maintien de l'intégrité structurale de la membrane, Les globules rouges sont flexibles et capables de survivre dans la circulation et sont capables de se faufiler à travers la microvascularisation à des vitesses élevées sans dommage permanent (Li *et al.*, 2007, 2005). Ils peuvent se déformer avec une extension linéaire jusqu'à environ 250%, tandis qu'une augmentation de 3 à 4% de la surface entraîne la lyse de la cellule. La membrane plasmique est composée d'une bicouche lipidique avec des protéines transmembranaires intégrées qui forment des complexes multi-protéiques. La bicouche elle-même est constituée de proportions égales de cholestérol et de phospholipides (Pretini *et al.*, 2019).

En raison de l'inactivation progressive des voies métaboliques des érythrocytes par le vieillissement, la membrane cellulaire perd son intégrité naturelle, sa flexibilité et sa composition chimique (Anderson *et al.*, 2018). Ces changements, entraînent finalement la destruction de ces cellules par les macrophages dans le foie et la rate. Ces cellules présentent un «selfmarker», le CD47, au cours de leur durée de vie, ce qui empêche leur phagocytose. Mais en vieillissant, elles deviennent sénescents et le niveau et / ou la distribution du CD47 à leur surface peut changer. Cette altération des niveaux du CD47 stimule les macrophages dans le foie et la rate à les éliminer (Khandelwal *et al.*, 2007).

1.3.4 Protéome des érythrocytes

Les érythrocytes contiennent des composants cellulaires considérablement plus actifs que ne le suggère leur rôle principal et peuvent être plus complexes que ce qui est décrit de manière conventionnelle (Kabanova *et al.*, 2009). 2 289 protéines uniques ont été identifiées dans les érythrocytes. Plus de la moitié de ces protéines sont directement associées à la membrane ou au cytosquelette dont 6% sont des protéines organellaires, y compris des protéines de transport spécifiques pour le réseau de Golgi, le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Pasini *et al.*, 2006). D'autres études ont identifié la présence de facteurs d'initiation de la traduction et des protéines pour la défense cellulaire (Kakhniashvili *et al.*, 2004).

L'hémoglobine (Hb) est la protéine la plus importante des érythrocytes. C'est une protéine contenant de l'hème et est responsable de la liaison de O₂ / CO₂ à l'intérieur des érythrocytes (Hamidi and Tajerzadeh, 2003). Elle est formée de 2 chaînes polypeptidiques α et β , composées d'un anneau de porphyrine portant un atome ferreux qui peut se lier de manière réversible à une molécule d'oxygène (Said *et al.*, 2015).

1.3.5 Fonctions des érythrocytes

1.3.5.1 Échanges gazeux et maintien de l'homéostasie oxydative

La principale fonction des érythrocytes est l'échange de gaz dans laquelle ils transportent l'oxygène des poumons vers les tissus. L'hémoglobine intracellulaire dans ces cellules représente plus de 95% des protéines cellulaires totales et le noyau de fer de ces molécules permet la liaison et la libération d'oxygène ou de dioxyde de carbone selon les besoins. Au fil du temps, l'hémoglobine est lentement oxydée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) endogènes en méthémoglobine à un taux d'environ 4% par jour. Cette oxydation endommage la protéine au point qu'elle ne peut plus lier l'oxygène pour le transport. Toute libération supplémentaire de ROS au cours de ce processus est facilement neutralisée par les facteurs antioxydants intracellulaires disponibles. En plus de la pression de stress oxydant intracellulaire, les ROS exogènes produits par des cellules telles que les cellules T sont également éliminées de la circulation par les globules rouges. Comme ils peuvent se lier et neutraliser facilement ces ions potentiellement nocifs, les globules rouges ont été proposés comme puits oxydant pour les ROS (Kim *et al.*, 2009). Afin d'atténuer les dommages induits par le stress oxydatif, les globules rouges ont un système antioxydant très complexe qui englobe à la fois les facteurs enzymatiques (catalase et glutathion peroxydase) et non enzymatiques

(glutathion et acide ascorbique). Bien que ces processus soient très efficaces, les dommages cellulaires se produisent pendant la vie des globules rouges. Le système antioxydant des globules rouges est principalement cytosolique, ce qui rend la gestion du stress oxydatif sur la membrane moins efficace. Une accumulation de ROS au niveau de la membrane cellulaire entraîne généralement une déformabilité cellulaire et une peroxydation lipidique de la membrane, provoquant par la suite une hémolyse (Johnston *et al.*, 1993; Öztürk *et al.*, 2003). Si elle n'est pas gérée rapidement, l'hémolyse induite par le stress oxydatif peut endommager les tissus locaux en raison de la libération inévitable de ROS. Dans un système sain, cela est généralement géré par des globules rouges plus jeunes qui sont plus facilement capables de nettoyer les ROS exogènes. Cependant, ce système ne fonctionne pas parfaitement dans des environnements inflammatoires. Comme il a été rapporté par Castillo *et al.*, la chirurgie à cœur ouvert peut causer d'autres dommages aux tissus à la suite de la libération de ROS et les ROS libres observés dans l'environnement local sont probablement un résultat direct de l'hémolyse. Ainsi, les globules rouges jouent un rôle clé dans le maintien l'homéostasie oxydative et tout dysfonctionnement de cette activité est susceptible d'entraîner des effets néfastes en aval (Castillo *et al.*, 2011).

1.3.5.2 Fonctions enzymatiques et métabolisme du glucose

Les enzymes des érythrocytes et de leurs membranes sont omniprésentes. Dans le cytosol, des enzymes telles que la catalase et la glutathion peroxydase minimisent les effets du stress oxydatif, et un complexe de protéase (le protéasome 20S) dégrade les protéines endommagées. Par ailleurs, la membrane des érythrocytes contient un complexe enzymatique glycolytique qui est nécessaire au métabolisme cellulaire. Un certain nombre d'ATPases pour médier le transfert d'ions à travers la membrane et des enzymes protéolytiques ont été identifiés (Molinari *et al.*, 1994). Une synthase d'oxyde nitrique fonctionnelle a également été identifiée à la fois dans la membrane et le cytosol des globules rouges ("Diagnostic and therapeutic technology assessment. Bone marrow transplantation in childhood leukemia," 1984).

Bien que les érythrocytes matures ne contiennent pas d'organites, ils ont toujours besoin de métaboliser le glucose pour répondre à leurs besoins énergétiques et ainsi, en l'absence de mitochondries, une glycolyse anaérobie par la voie Embden-Meyerhof se produit. Un complexe d'enzymes glycolytiques situé au niveau de la membrane des globules rouges est responsable de cette activité (van Wijk and van Solinge, 2005).

1.3.6 Rôle des érythrocytes dans la réponse immunitaire

Dans la littérature classique, les érythrocytes humains ont longtemps été classés comme de simples transporteurs d'oxygène. Cependant, des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent que ces cellules jouent également un rôle important dans la réponse immunitaire innée (Hotz *et al.*, 2018). Malgré leur perte d'organites pendant l'érythropoïèse et leur incapacité à effectuer la transcription et la traduction, les érythrocytes de l'homme conservent la capacité d'interagir avec les molécules inflammatoires endogènes et exogènes dans le sang. En effet, ces cellules ont la capacité de se lier et d'interagir avec une variété de molécules inflammatoires, y compris les chimiokines, les acides nucléiques et les agents pathogènes, régulant et modulant ainsi les réponses immunitaires. Les composants internes des érythrocytes tels que l'hémoglobine et l'hème sont également de formidables facettes de l'immunité innée, capables de générer des ROS antimicrobiens. (Anderson *et al.*, 2018). Par ailleurs, les érythrocytes expriment un grand nombre de récepteurs de surface cellulaire qui médient leurs interactions avec les agents endogènes et exogènes dans le sang, ce qui leur confère une capacité étendue de piéger ou de séquestrer des molécules en circulation (Baum *et al.*, 2002).

Bien que le transport d'oxygène soit leur fonction principale, l'hémoglobine et l'hème libre participent également à la réponse immunitaire innée. Il a été caractérisé comme un puissant signal de danger *in vitro*, capable d'activer l'expression médiée par NF- κ B de protéines pro-inflammatoires (y compris IL-1 et TNF- α), la génération des ROS intracellulaires, une augmentation de 100 fois de la transcription des gènes pro-inflammatoires, et la libération par les macrophages de TNF- α et IL-1 (Hao *et al.*, 2011). Il a été suggéré que l'hème libre ne pouvait pas causer de dommages par lui-même mais produisait plutôt des effets délétères uniquement en présence d'autres modulateurs immunitaires. Cependant, d'autres études ont démontré que l'hème libre est un activateur indépendant de TLR4, stimulant la sécrétion de TNF- α , de ROS et de leucotriène B4 par les macrophages (Anderson *et al.*, 2018).

1.3.6.1 Liaison aux chimiokines

Une propriété immunomodulatrice importante des érythrocytes humains est leur capacité de se lier à une grande variété de chimiokines. Un récepteur majeur pour cette liaison est le récepteur DARC, qui a d'abord été reconnu par Darbonne et ses collègues. Ce travail a démontré que les érythrocytes agissent comme des puits pour CXCL8, inactivant ainsi le gradient de chimiokine dépendant de CXCL8 et empêchant le recrutement des neutrophiles (Darbonne *et al.*, 1991). DARC lie également d'autres protéines immunomodulatrices à affinité élevée, y compris des

chimiokines CXC et CC supplémentaires en plus de CXCL8 (Lee *et al.*, 2006). Il a été suggéré que la séquestration des molécules inflammatoires par les récepteurs de surface des globules rouges fonctionne pour amortir la réponse immunitaire via l'atténuation de la signalisation des neutrophiles (Darbonne *et al.*, 1991). Cette liaison aux chimiokines est superficielle et facilement réversible. Ainsi, les récepteurs érythrocytaires pourraient libérer leurs substrats dans le microenvironnement tissulaire. Fukuma *et al.* ont suggéré que les érythrocytes éliminent les chimiokines des sites d'inflammation mais les libèrent finalement en réponse à la diminution de la concentration plasmatique des chimiokines, maintenant efficacement l'homéostasie (Fukuma *et al.*, 2003).

1.3.6.2 Interactions avec les cellules immunitaires

La plupart des recherches sur l'activité des cellules immunitaires sont effectuées sur des monocultures contenant la cellule cible. Le dogme de l'immunologie enseigne que les autres cellules dans le sang, comme les globules rouges ou les plaquettes, sont inertes et ne contribueraient pas à l'activité du système immunitaire. Cependant, toutes les recherches récentes sur les érythrocytes suggèrent qu'il est peu probable que ce soit le cas. En effet, les données de la littérature démontrent que les globules rouges représentent non seulement un mécanisme efficace pour contrer le stress oxydatif, mais aussi un autre outil pour maintenir l'homéostasie immunologique (Figure 1.9). Cependant, lorsqu'une production intense d'espèces réactives a lieu, les érythrocytes peuvent acquérir un comportement pro-oxydant et perdre leurs caractéristiques structurelles et fonctionnelles typiques. En particulier, les lésions oxydatives sur les composants de la membrane, du cytosquelette et du cytoplasme des érythrocytes peuvent représenter des signaux de danger pour l'immunité innée et adaptative (Buttari *et al.*, 2015).

Il a été rapporté que les cellules NK, en présence de globules rouges, étaient plus cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales. Dans cette étude la cytotoxicité médiée par les cellules NK est considérablement améliorée en présence de globules rouges. L'amélioration dépend du nombre de globules rouges présents et peut être induite par des globules rouges, allogéniques ou xénogéniques. La cytotoxicité des cellules NK améliorée *in vivo* par les globules rouges n'est pas claire. Cependant, il est intéressant de noter que l'activité des cellules NK du sang périphérique et de la rate est beaucoup plus élevée que celle des lymphocytes issus à partir d'autres tissus lymphoïdes tels que les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, le thymus et la lymphe (Shau and Golub, 1988).

Un certain nombre d'études ont présenté des preuves montrant que les globules rouges peuvent moduler la prolifération des cellules T, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les globules rouges sont capables d'améliorer l'expansion et la survie des lymphocytes T en inhibant la mort des lymphocytes T activés. Cette caractéristique n'est observée qu'avec des globules rouges intacts et lorsque les globules rouges étaient en contact étroit ou à proximité des lymphocytes T activés. Il a été démontré aussi que les globules rouges libèrent des facteurs protéiques capables de soutenir la croissance et la survie des lymphocytes T (Buttari *et al.*, 2015).

Les interactions entre les macrophages et les érythrocytes sont importantes pour la clairance des érythrocytes et l'homéostasie. Dans le foie et la rate, les macrophages résidentiels reconnaissent et éliminent de la circulation les érythrocytes en fin de vie ou qui ont subi des dommages irréparables (Buttari *et al.*, 2015). Étant donné que ces derniers ne sont pas en mesure de synthétiser de nouvelles protéines, tous les marqueurs d'élimination représentent le résultat des modifications dans des molécules préexistantes ou de l'acquisition d'opsonines dérivées du plasma dirigées contre ces modifications. De nouvelles preuves suggèrent que le vieillissement des érythrocytes induit un changement conformationnel du CD47 qui fait passer la molécule d'un inhibiteur à un activateur (de Back *et al.*, 2014). D'autre part, Il a été montré que la transfusion de globules rouges après stockage prolongé induisait les macrophages à se polariser vers l'activation de la voie classique des macrophages M1 associée à la production de cytokines pro-inflammatoires et à l'immunostimulation. La transfusion de sang frais dans des conditions non inflammatoires est associée à une diminution de la clairance des globules rouges et donc à une moindre charge des macrophages avec l'hème, ainsi qu'à une régulation positive de l'hème oxygénase et à une polarisation vers la voie M2, qui est associée à une immunorégulation par l'induction des lymphocytes T régulateurs (Hod *et al.*, 2010; Yazdanbakhsh *et al.*, 2011).

Schäkel et ses collègues ont montré que les érythrocytes sont capables de contrôler la production d'IL-12 et du TNF- α par les cellules dendritiques en circulation en réponse au LPS. L'expression du CD47 sur les érythrocytes et les cellules dendritiques circulantes semblent être critiques pour cette inhibition (Schäkel *et al.*, 2006). De plus, Les érythrocytes sont capables d'empêcher une maturation complète des cellules dendritiques en réponse aux LPS, induisant ainsi des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles typiques des cellules dendritiques tolérogènes et caractérisées par une réduction du CD83, HLA-DR, CD80 et CD86 et associée à une faible production d'IL-12, d'IL-6 et de TNF- α et à une production élevée d'IL-10. L'expression altérée de CD47 à la surface des érythrocytes ou sa perte pourrait représenter le

mécanisme principal déterminant la déficience fonctionnelle des érythrocytes dans leur interaction avec les cellules dendritiques (Buttari *et al.*, 2015).

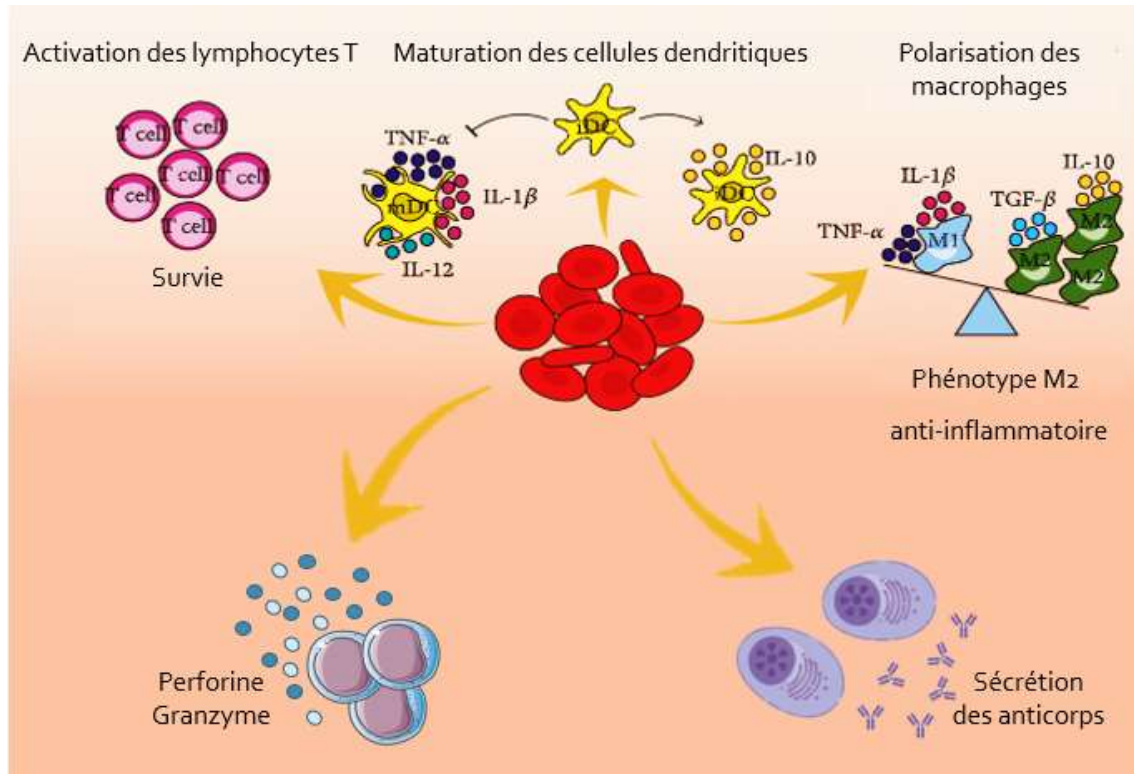


Figure 1.9. Interactions entre les globules rouges sains ou oxydés/sénescents et les cellules immunitaires (Adapté de Buttari *et al.*, 2015)

L'interaction entre les globules rouges et les fibroblastes a été largement évaluée par un groupe de chercheurs qui ont démontré que la présence de globules rouges dans une culture de fibroblastes modifie la fonction et le sécrétome de ces cellules. Contrairement à l'effet des globules rouges sur la prolifération et la survie des lymphocytes T, les globules rouges suppriment la prolifération des fibroblastes et stimulent l'apoptose. Ils favorisent également la contraction du collagène médiée par les fibroblastes, la sécrétion de la chimiokine IL-8, ainsi que la sécrétion de certains métalloprotéinases. Cette modulation de l'activité des fibroblastes illustre le rôle des érythrocytes dans le processus de la cicatrisation des plaies (Fredriksson, 2003, p. 8; Fredriksson *et al.*, 2006, 2004).

Virella *et al.* ont étudié l'effet des globules rouges autologues sur l'activité des lymphocytes B et ont rapporté une augmentation significative de la sécrétion d'immunoglobulines et de la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ . Une autre étude a rapporté que les globules rouges

favorisaient la migration des éosinophiles à travers les cellules endothéliales en éliminant la chimiokine RANTES, suggérant ainsi un rôle pour les globules rouges dans l'inflammation allergique (Kanda *et al.*, 2004).

1.4 Frontières érythrocytes - microenvironnement tumoral – cellules NK

1.4.1 Les érythrocytes dans le microenvironnement tumoral

L'hémorragie est une manifestation clinique courante chez les patients atteints de cancer. Il a été démontré que l'hémorragie intratumorale est un facteur de mauvais pronostic pour les patients cancéreux. Les globules rouges stimulent fortement la prolifération des cellules tumorales et la croissance des tumeurs. Aussi les globules rouges activent la voie NF- κ B dans les cellules tumorales. Les érythrocytes induisent également une chimiorésistance. Par ailleurs, la croissance tumorale induite par les globules rouges est accompagnée d'une signature inflammatoire, d'une augmentation du système vasculaire tumoral et d'un afflux de macrophages M2. De plus, les globules rouges augmentent l'expression de plusieurs récepteurs se liant aux nucléotides et induisant la libération d'IL-1b (Yin *et al.*, 2015). D'autre part, sachant que les érythrocytes peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'activation immunitaire, la différenciation et la prolifération, leur capacité à interagir avec les cellules immunitaires peut être modifiée s'ils sont en contact avec les cellules cancéreuses. Ceci soutient l'hypothèse que les globules rouges sont capables de séquestrer et libérer des cytokines dans le sang, et que la présence de ces cellules dans un environnement tumoral peut également affecter la réponse des cellules immunitaires (Karsten *et al.*, 2020).

Il a été observé que chez les patients recevant plusieurs transfusions de globules rouges, une expansion préférentielle similaire aux cellules T CD8 régulatrices a été rapportée. De plus, les participants recevant de multiples transfusions pour anémie falciforme ou hémophilie avaient des niveaux significativement plus élevés de lymphocytes T CD8 par rapport aux témoins non transfusés. Il a été suggéré que cette prolifération préférentielle des cellules T CD8 pourrait être l'une des raisons de l'immunosuppression observée après les transfusions de globules rouges. Cette immunosuppression induite par transfusion semble être bénéfique pour des indications spécifiques, par exemple, il a été signalé que l'administration de transfusions de globules rouges avant la chirurgie de transplantation rénale était fortement corrélée à une meilleure survie du greffon. Dans le cancer, cependant, il a été signalé que les transfusions de globules rouges favorisaient l'immunosuppression et, par conséquent, la progression de la maladie. Une autre étude a également démontré que les cytokines détectées dans les milieux de culture des PBMC traités par des érythrocytes préalablement exposés à un microenvironnement tumoral présentent le développement d'un profil immunosuppresseur (Karsten *et al.*, 2020).

1.4.2 Modulation des cellules NK par les érythrocytes

Il a été rapporté que les cellules NK, en présence de globules rouges, sont plus cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales. Dans cette étude la cytotoxicité médiée par les cellules NK est considérablement améliorée en présence de globules rouges. L'amélioration dépend du nombre des globules rouges présents et peut être induite par des globules rouges, allogéniques ou xénogéniques. Cependant, le mécanisme d'amélioration *in vivo* de la cytotoxicité des cellules NK par les globules rouges reste pas claire (Shau and Golub, 1988).

1.5 Le mouvement cellulaire

Le mouvement est une fonction cellulaire fondamentale dans les organismes multicellulaires (Ogita and Takai, 2008). Il est de plus en plus reconnu que les cellules dans tout le corps peuvent détecter les changements dans leur environnement mécanique et, en fonction de ces changements, régulent des processus fondamentaux, tels que la division et la différenciation cellulaires, par le biais de mécanismes opérant à de nombreux niveaux (canaux ioniques, modifications transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles) (Benjamin and Hillen, 2003). L'expansion des cellules en *ex vivo* est une étape clé dans de nombreux protocoles d'immunothérapie cellulaire, qui nécessitent un nombre de cellules immunitaires suffisant pour éradiquer les cellules malignes. L'utilisation des systèmes de culture agités pour l'expansion des cellules offre de nombreux avantages potentiels par rapport aux systèmes de culture statiques couramment utilisés aujourd'hui. Notamment l'homogénéité des conditions de culture, la facilité d'échantillonnage et la mise en œuvre de systèmes de contrôle des paramètres de la culture (Carswell and Papoutsakis, 2000), qui peuvent avoir des effets profonds sur la prolifération et les fonctions des cellules en culture (Katafuchi *et al.*, 1993; Koller *et al.*, 1992; McAdams *et al.*, 1997; McDowell et Papoutsakis, 1998a). Cependant, l'agitation reste un paramètre crucial qui n'est souvent pas pris en compte lors des cultures cellulaires dans des microplaques ou des flasques à petite contenance (Juyoung Kim *et al.*, 2019).

1.6 Problématique et objectifs

1.6.1 Problématique

Sachant que n'importe quelle cellule est capable de détecter des changements dans son environnement mécanique et de promouvoir des changements et des adaptations de la structure et du fonctionnement des tissus, des changements dans les propriétés des globules rouges peuvent se produire à n'importe quel endroit, y compris les organes et les tissus lymphoïdes périphériques, où ils peuvent entrer en contact avec des cellules malignes et/ou des cellules de l'immunité innée, y compris les cellules NK. Il serait donc tout à fait possible que le changement du dynamisme des globules rouges influence considérablement leur physiologie, et par conséquent les activités des cellules voisines.

1.6.2 Objectifs

Evaluer les activités antitumorales ex vivo des cellules NK provenant de patients avec cancer solide ou de sujets sains, en présence ou en absence des érythrocytes autologues ou non autologues, dans deux conditions différentes : la stagnation et le mouvement.

1.6.3 But

Montrer que le faible mouvement ou la stagnation des globules rouges et des cellules NK des patients néoplasiques peuvent avoir un effet sur la prolifération et de la survie des cellules NK, ainsi que sur leur capacité à produire des cytokines antitumorales.

CHAPITRE 2

Chapitre 2. Matériel et méthodes et diffusion des résultats

Cette thèse a fait l'objet d'une publication internationale après des révisions mineures dans une revue de Catégorie A, avec Comité de lecture spécialisé en Immunologie (*Immunology Letters* : Journal officiel de la Fédération Européenne des Sociétés d'Immunologie (EFIS), membre de l'Union Internationale des Sociétés d'Immunologie).



Lack of cell movement impairs survival of peripheral blood IL-2-stimulated natural killer cells originating from solid cancer and promotes red blood cells to induce their switch toward a regulatory phenotype

Zeyneb Hadjidj, Rabia Messali, Mourad Aribi*

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000, Tlemcen, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:
Cell survival
Cytokines
Foxp3
Peripheral IL-2-stimulated NK cells
Red blood cells
Shaking
Solid cancer

ABSTRACT

Background: Red blood cells (RBCs) can have a modulatory effect on immune cells; so changes in their dynamism could considerably influence their physiology, and consequently the immune activities of neighbouring cells, like natural killer (NK) cells. Herein, we studied the effect of both RBCs and lack of cell movement on the proliferation, survival and regulation of peripheral IL-2-stimulated NK cells from normal and solid malignant conditions.
Methods: Experiments were conducted on twelve cell culture groups, including NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls, cultured alone or with autologous or nonautologous RBCs under shaking or no shaking conditions.
Results: NK cells from neoplastic patients behaved differently depending on the culture conditions including shaking and/or RBCs presence. Therefore, NK cells survival was downregulated in the absence of shaking; whereas, shaking have not only upregulated cell survival, but also downregulated the levels of p53-related apoptosis. Moreover, RBCs enhanced NK cells proliferation; while, this effect was modulated by shaking. Furthermore, RBCs can generate opposite effects on the production and modulation of protumoral or immunosuppressive cytokines, depending on the origin of NK cells, *i.e.*, whether they derive from healthy or solid malignant tumor conditions. Finally, NK cells become able to express Foxp3 regulatory marker when combining three main conditions that include (i) treatment with high dose of IL-2, (ii) presence of RBCs, and (iii) absence of shaking.
Conclusions: Our outcomes showed for the first time that cell stagnation would be markedly involved in peripheral NK cell apoptosis, as well as in switching toward a regulatory phenotype-induced Foxp3. Cell movement may be one of *ex vivo* potential approaches in boosting the activities and survival of such cells during solid cancer.

Bureau éditorial : <https://www.journals.elsevier.com/immunology-letters/editorial-board>

Indexation :

1. *SIIC Data Bases*
2. *BIOSIS Citation Index*
3. *Chemical Abstracts*
4. *Current Contents - Life Sciences*
5. *Embase*
6. *PubMed/Medline*
7. *Pascal Francis*
8. *Reference Update*
9. *Science Citation Index*
10. *Scopus*



Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/immllet

Lack of cell movement impairs survival of peripheral blood IL-2-stimulated natural killer cells originating from solid cancer and promotes red blood cells to induce their switch toward a regulatory phenotype



Zeyneb Hadjidj, Rabia Messali, Mourad Aribi*

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000, Tlemcen, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:
Cell survival
Cytokines
Foxp3
Peripheral IL-2-stimulated NK cells
Red blood cells
Shaking
Solid cancer

ABSTRACT

Background: Red blood cells (RBCs) can have a modulatory effect on immune cells; so changes in their dynamism could considerably influence their physiology, and consequently the immune activities of neighbouring cells, like natural killer (NK) cells. Herein, we studied the effect of both RBCs and lack of cell movement on the proliferation, survival and regulation of peripheral IL-2-stimulated NK cells from normal and solid malignant conditions.

Methods: Experiments were conducted on twelve cell culture groups, including NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls, cultured alone or with autologous or nonautologous RBCs under shaking or no shaking conditions.

Results: NK cells from neoplastic patients behaved differently depending on the culture conditions including shaking and/or RBCs presence. Therefore, NK cells survival was downregulated in the absence of shaking; whereas, shaking have not only upregulated cell survival, but also downregulated the levels of p53-related apoptosis. Moreover, RBCs enhanced NK cells proliferation; while, this effect was modulated by shaking. Furthermore, RBCs can generate opposite effects on the production and modulation of protumoral or immunosuppressive cytokines, depending on the origin of NK cells, *i.e.*, whether they derive from healthy or solid malignant tumor conditions. Finally, NK cells become able to express Foxp3 regulatory marker when combining three main conditions that include (i) treatment with high dose of IL-2, (ii) presence of RBCs, and (iii) absence of shaking.

Conclusions: Our outcomes showed for the first time that cell stagnation would be markedly involved in peripheral NK cell apoptosis, as well as in switching toward a regulatory phenotype-induced Foxp3. Cell movement may be one of *ex vivo* potential approaches in boosting the activities and survival of such cells during solid cancer.

1. Introduction

As a first line of immune defense, NK cells constitute the main effectors involved in innate immunity, and represent key cells of immune surveillance thanks to their ability of recognition and killing a wide range of transformed tumor and infected cells [1–3]. They are one of the most promising cells for cancer therapies [4], and can be more universally applied and particularly effective for the treatment of solid malignancies that have lost expression of self-major histocompatibility complex as a mechanism of immune escape from T-cells. Additionally, in contrast to vaccine therapy or antigen-specific adoptive T-cell therapy, the identification of target tumor antigens is not required for NK cell therapy [5]. However, the major challenge in NK cells-based immunotherapy is their low-frequency as lymphoid line-driven cells (up

to 15 % of human circulating lymphocytes [6,7]), which make difficult to have sufficient numbers of functional cells [4].

NK cells are characterized by the expression of CD56 and CD16 phenotypic markers and the lack of CD3 and CD19 [8]. The largest fraction of peripheral blood NK cells (PBNKCs) ($\geq 90\%$) corresponds to the cytotoxic subpopulation [7,9] whereas the remaining NK cells are specialized in cytokine production and immunoregulation [10]. PBNKCs express functional receptors for interleukin-2 (IL-2) [6], a lymphocyte growth factor mainly produced by T-cells [11], which plays a key role in the differentiation, activation, proliferation, survival and functional activities of PBNKCs [12]. IL-2 can enhance NK cells cytotoxicity against a wide range of human tumor cells, including solid cancer cells [13], and increase their cytokine production, especially interferon gamma (IFN- γ) [14]. Moreover, in response to IL-2-

* Corresponding author at: Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, Imama-Mansourah, Rocade # 2, Department of Biology, University of Tlemcen, PO Box: 262, Imama-Mansourah, 13000, Tlemcen, Algeria.

E-mail addresses: mourad.aribi@univ-tlemcen.dz, m_aribi@outlook.fr, m_aribi@yahoo.fr (M. Aribi).

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.02.002>

Received 21 December 2019; Received in revised form 30 January 2020; Accepted 2 February 2020

Available online 03 February 2020

0165-2478/ © 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of European Federation of Immunological Societies.

stimulation, interplay between highly purified PBNKCs may be responsible of a synergetic increase of their activation, proliferation, and antitumor function [15].

RBCs make up 40–50 % of the total human blood [16] that consist the most abundant cells in the body [17]. Several studies have reported haemostatic abnormalities and alteration of both function and structure of RBCs in malignant diseases [18,19]. It has also been demonstrated that extravascular RBCs potently promote tumor cell proliferation, syngeneic tumor growth, tumor vasculature, recruitment of non-classical M2 macrophages, and therapeutic resistance [20]. Moreover, it has been suggested that RBCs can have a modulatory effect on immunologic activities and this effect may contribute to trigger and preserve inflammatory responses by favouring chronic inflammatory conditions [20,21]. Furthermore, prior studies [22,23] have reported that RBCs would have the ability to induce, promote and modulate cell-mediated cytotoxic activity of PBNKCs.

Of note, RBCs can be considered as flexible and circulating cells “*par excellence*”. They have the great ability to sneak into all blood vessels and capillaries, and move to irrigated locations throughout the body given their natural deformation and reversible aggregation properties. While, such properties can be changed particularly when subjected to external forces such as hydrodynamic stresses [24]. Knowing that any cell is able to detect changes in its mechanical environment and promote changes and adaptations of the structure and function of tissues [25], changes in RBC properties could occur at any location, including peripheral lymphoid organs and tissues, where they could come into contact with malignant cells and/or innate immune cells, including NK cells. Additionally, it would be quite possible that the change in the dynamism of RBCs could considerably influence their physiology, and consequently the activities of neighbouring cells. In this context, we have tried for the first time to show that the weak movement/stagnation of RBCs and IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor (SMT) could cause disorders in the proliferation and survival of NK cells, as well as on their ability to produce antitumor cytokines.

2. Materials and methods

2.1. Study design

This study was conducted on six cell culture groups including NK cells from patients with SMT or from healthy controls cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs (Fig. 1). Experiments were performed under shaking or not, resulting in a total of twelve NK cell culture groups:

- a. NK cells from healthy controls
 - i cultured alone without shaking,
 - ii cultured alone under shaking,
 - iii cocultured with autologous RBCs without shaking,
 - iv cocultured with autologous RBCs under shaking,
 - v cocultured with nonautologous RBCs from patients with SMT without shaking,
 - vi cocultured with nonautologous RBCs from patients with SMT under shaking.
- b. NK cells from patients with SMT
 - i cultured alone without shaking,
 - ii cultured alone under shaking,
 - iii cocultured with autologous RBCs without shaking,
 - iv cocultured with autologous RBCs under shaking,
 - v cocultured with nonautologous RBCs from HC without shaking,
 - vi cocultured with nonautologous RBCs from HC under shaking.

2.2. Cell purification and culture conditions

Venous blood was drawn in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) vacutainer tubes (BD Vacutainer) from nine newly diagnosed and

untreated patients with SMT and nine age-, sex- and blood group-matched healthy volunteer donors (controls) after approval by the Ethics Committee of University of Tlemcen (Algeria) and obtaining written informed consent from each participant. PBNKCs were purified using density gradient centrifugation (lymphocyte separation medium, Lonza, Basel, Switzerland) and negative magnetic selection (EasySep Human NK cell Enrichment kit, StemCell, Vancouver, Canada; up to 95 % purity of CD56⁺CD3⁻). Erythrocytes were lysed by ammonium-chloride-potassium (ACK) Lysing Buffer. NK cell numbers and viability were evaluated by Trypan Blue Exclusion Test (TEBET). For RBCs separation, whole blood was centrifuged, and the plasma, buffy coat and uppermost erythrocytes were eliminated. The remaining erythrocytes were washed in phosphate-buffered saline (PBS), and suspended in PBS containing 5 mM glucose. NK cells were seeded at 2×10^5 cells/well and overnight IL-2-stimulated [26] in complete RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), containing 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 50 µg/mL streptomycin, 50 U/mL penicillin, 10 % heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) and 500 U/mL of recombinant human IL-2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). RBCs from patients with SMT or from healthy controls were resuspended in complete RPMI medium and then added to the cell culture at the NK:RBC ratio of 1:20 [27]. After 48 h coculture with or without constant gentle shaking, supernatants and NK cells were harvested for cytokine assays and cell analyses respectively. NK cells cultured in the same conditions, but in the absence of RBCs were kept as controls. All experiments were repeated at least three times.

2.3. Shaking culture system

To assess NK cells viability and proliferation, apoptosis-related tumor suppressor protein 53 (p53), anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 protein (Bcl-2), forkhead box protein 3 (Foxp3), and cytokine release, cell cultures were performed under shaking culture system or not. To avoid cell adherence and promote free cell interactions, shaking culture systems were unrolled with continuous and constant gentle shaking in 3D 96-well Nunclon Sphera microplates (Thermo, USA). For no shaking conditions, cells were cultured in flat bottom 96-well polystyrene microplates (Falcon, Corning, USA).

2.4. Cell viability assay

Cell viability was evaluated using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay kit, Sigma-Aldrich Inc, St Louis, MO, USA). Each group of purified and IL-2-stimulated NK cells was cultured as described above. MTT assay reagent was added to each well for the last 6 h incubation. Thereafter, the formazan precipitates in the cells was dissolved, and supernatants were harvested for optical density (OD) measurement. Wells containing NK cells alone were considered as control wells. Cell viability was calculated as follows:

$$\% \text{Viable cells} = \frac{\text{Absorbance of treated wells} - \text{Absorbance of blank wells}}{\text{Absorbance of control wells} - \text{Absorbance of blank wells}} \times 100$$

2.5. Cell proliferation assay

Cell proliferation was spectrophotometrically carried out by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation method, using Abcam's BrdU Cell Proliferation enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (ab126556, Abcam, Cambridge, UK). BrdU assay reagent was added to each well for the last 18 h incubation. Indirect ELISA was made to measure the incorporation of BrdU.

2.6. Apoptosis and cell signalling biomarkers assays

p53, Bcl-2, extracellular signal-regulated protein kinase-1/2 (ERK-1/2), phosphorylated ERK (p-ERK) and Foxp3 levels were evaluated by indirect ELISA in NK cells cultured as described above. NK cells were

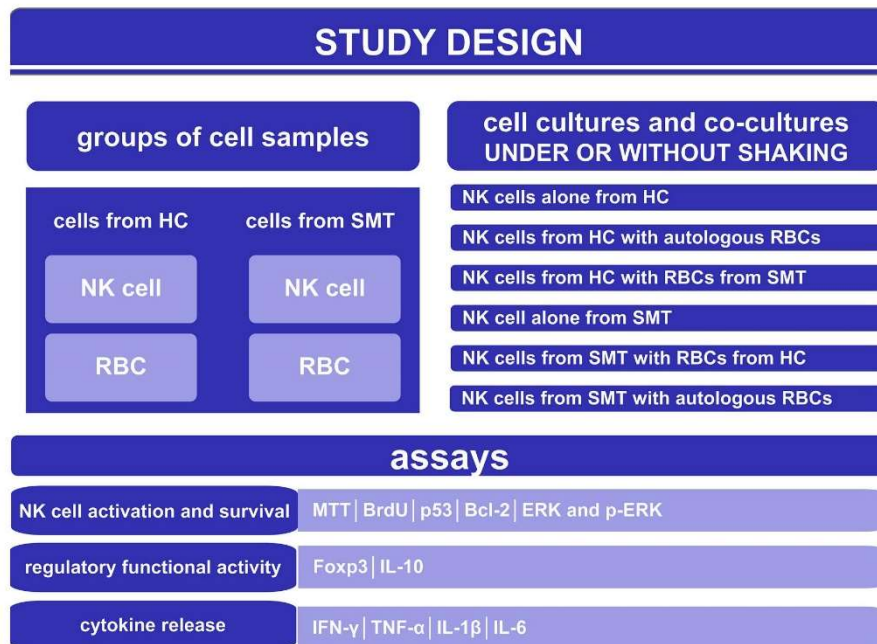


Fig. 1. Study flow-chart. In the current study, we tested RBC and cell movement effects on functional activities of human IL-2-stimulated NK cells. Assays were carried out at least three times on six cell groups cultured under shaking or not. Bcl-2: B-cell lymphoma 2, BrdU: bromodeoxyuridine, ERK: extracellular signal-regulated protein kinase, Foxp3: forkhead box protein 3, HC: healthy conditions, IFN- γ : interferon gamma, IL: interleukin, MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, NK: natural killer cell, p53: tumor suppressor protein 53, p-ERK: phosphorylated, RBC: red blood cell, SMT: patients with solid malignant tumor, TNF- α : tumor necrosis factor alpha.

washed with PBS, fixed and permeabilized with PBS containing 4 % paraformaldehyde and 0.5 % Triton X-100. Wells were washed with 0.05 % PBS-Tween 20 solution (v/v), then primary detector antibodies (Abcam, Cambridge, UK) were added to each well, and incubated for 2 h at room temperature. Thereafter, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody was added. After 1 h incubation, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was added. Finally, a last incubation was made for 30 min in the dark. The chromogenic reaction was stopped by the addition of 50 μ L 2 N phosphoric acid solution. The absorbance was read immediately at 450 nm using ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK).

2.7. Cytokine assays

The effect of RBCs and shaking conditions on the secretion of IFN- γ , tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-10, IL-1 β and IL-6 were measured in supernatants using human IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-1 β and IL-6 ELISA Kits (BD OptEIA), according to the manufacturer's protocol.

2.8. Statistical analysis

Results were reported as mean with standard error of mean (SEM). Comparisons were performed by parametric one-way analysis of variance (ANOVA) or non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by Tukey or Dunn post-hoc analyses, appropriately, as the data were normally or not normally distributed, respectively. *P*-values less than 0.05 were considered significant. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism software version 7.04 (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Shaking opposes RBCs effect and downregulates cell survival and proliferation

As shown by MTT and BrdU assays (Fig. 2), RBCs induced a significant increase in both MTT and BrdU levels regardless of culture condition ($p < 0.001$). By cons, shaking induced opposite effects to that of RBCs, i.e., a significant downregulation of the two variables levels ($p < 0.001$). Furthermore, stagnation downregulated NK cells survival and upregulated proliferation of NK cells from SMT conditions.

3.2. NK cell Bcl-2 expression is not affected by shaking in monoculture or coculture systems

As observed in Fig. 3, both shaking and RBCs have no significant effect on Bcl-2 expression by NK cells ($p > 0.05$).

3.3. Shaking downregulates the increased expression of ERK and p-ERK

As depicted in Fig. 4, nonautologous RBCs induced increased expression of ERK in NK cells from healthy conditions ($p < 0.01$) and p-ERK in NK cells from all conditions under or without shaking ($p < 0.001$). However, shaking induced a significant downregulation of both ERK expression ($p < 0.05$) and phosphorylation ($p < 0.001$) whatever the condition. Both shaking and RBCs induced a significant upregulation of ERK phosphorylation in NK cells from healthy conditions ($p < 0.001$).

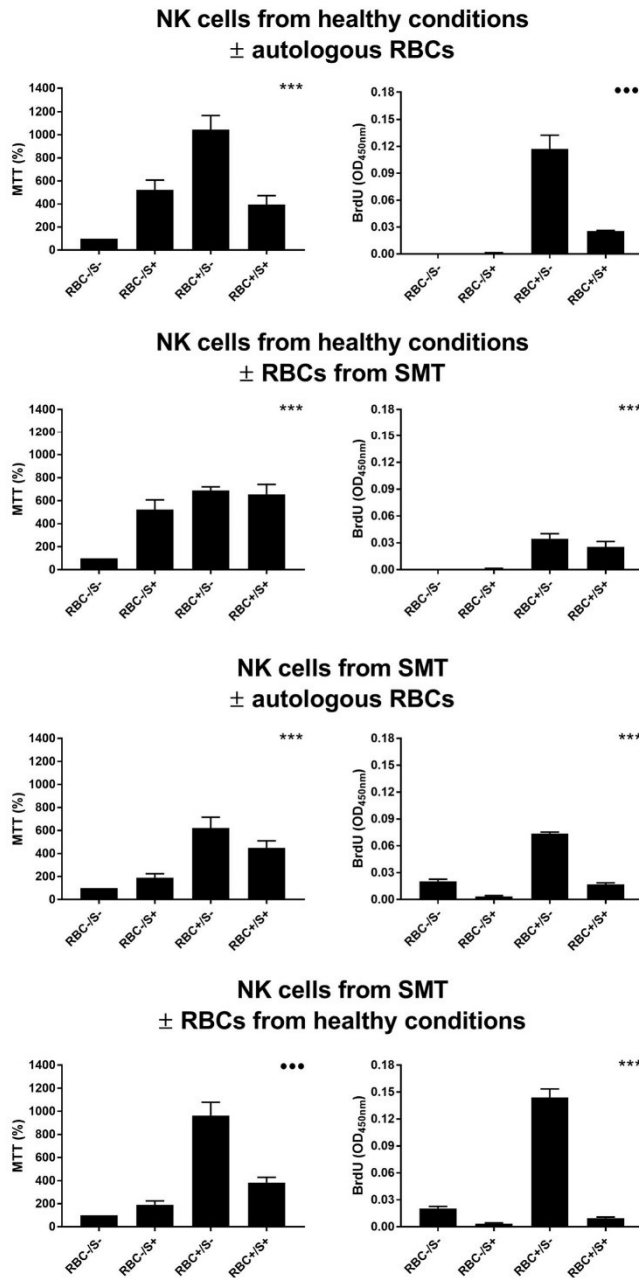


Fig. 2. Effects of RBCs and shaking on NK cells survival and proliferation in healthy and solid malignant tumor conditions. IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls were cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs, under shaking or stagnation conditions. Each histogram shows changes in cell viability and proliferation for the indicated group. Data are presented as mean values with standard error of mean (SEM). Cell viability was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and cell proliferation by bromodeoxyuridine (BrdU) method. HC: healthy conditions, NK: natural killer cells, OD: optical density, RBCs: red blood cells, SMT: solid malignant tumor conditions, RBC-/S-: NK cells cultured alone without shaking, RBC+/S-: NK cells cultured with RBCs without shaking, RBC-/S+: NK cells cultured alone under shaking, RBC+/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking. Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test: *** $P < 0.001$. Black dots indicate significant differences highlighted between all groups using Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-test for data that were not normally distributed: ••• $P < 0.001$.

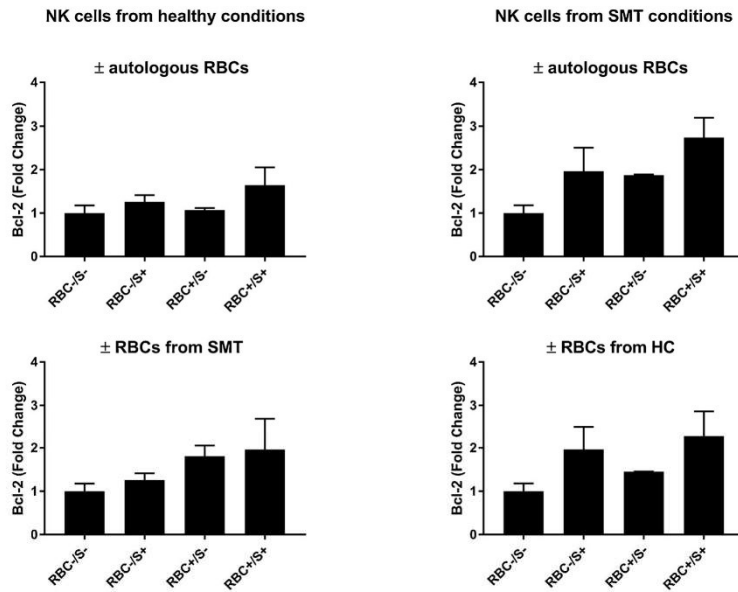


Fig. 3. Effects of RBCs and shaking on Bcl-2 expression levels in NK cells from healthy and solid malignant tumor conditions. IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls were cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs, under shaking or stagnation conditions. Each histogram shows changes in Bcl-2 levels for the indicated group after 48 h incubation. Data are presented as mean values \pm SEM. Bcl-2 levels in NK cells were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bcl-2: B-cell lymphoma 2 protein, HC: healthy conditions, RBCs: red blood cells, NK: natural killer cells, SMT: solid malignant tumor conditions, RBC-/S-: NK cells cultured alone without shaking, RBC+/S-: NK cells cultured with RBCs without shaking, RBC-/S+: NK cells cultured alone under shaking, RBC+/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking.

3.4. Shaking counteracts RBC effect inducing apoptosis-related p53 expression in NK cells

As shown in Fig. 5, nonautologous RBCs induced a significant effect on the expression of p53 in NK cells from healthy conditions ($p < 0.001$). Whereas, shaking induced a marked downregulation of p53 expression in all conditions, including coculture of NK cells with RBCs ($p < 0.01$).

3.5. Shaking downregulates IFN- γ release in the presence or absence of RBCs

We observed in Fig. 6 that shaking significantly downregulated the IFN- γ release whether in the presence or absence of RBCs ($p < 0.01$).

3.6. Shaking markedly upregulates the production of TNF- α in the presence or absence of RBCs

As depicted in Fig. 7, TNF- α levels were significantly upregulated in all groups of NK cells cocultured or not with RBCs under shaking as compared to all conditions without shaking ($p < 0.01$).

3.7. Shaking condition downregulates the production of regulatory/anti-inflammatory cytokine IL-10

As shown in Fig. 8, IL-10 levels in all groups of NK cells cocultured or not with RBCs under shaking were significantly downregulated compared to all groups of NK cells cocultured or not with RBCs in no shaking conditions ($p < 0.05$).

3.8. Shaking downregulates NK cell production of IL-1 β release in the presence or absence of RBCs

As shown in Fig. 9, IL-1 β levels were significantly downregulated in all groups of NK cells cultured or not with RBCs under shaking compared to culture or coculture system without shaking ($p < 0.01$).

3.9. Autologous RBCs upregulates IL-6 production in coculture with NK cells from healthy conditions, but nonautologous RBCs from healthy controls downregulates it in culture system of NK cells from SMT conditions under or without shaking

As shown in Fig. 10, IL-6 levels in coculture system containing NK cells from healthy conditions and autologous RBCs were significantly upregulated when compared with NK cells from healthy conditions cultured alone, either under or without shaking ($p < 0.01$). Additionally, IL-6 levels were markedly downregulated in coculture system containing NK cells from malignant conditions and nonautologous RBCs from healthy conditions in absence of shaking as compared to that of NK cells from malignant conditions cultured alone ($p < 0.05$).

3.10. Shaking has reverse effect of RBCs on Foxp3 expression

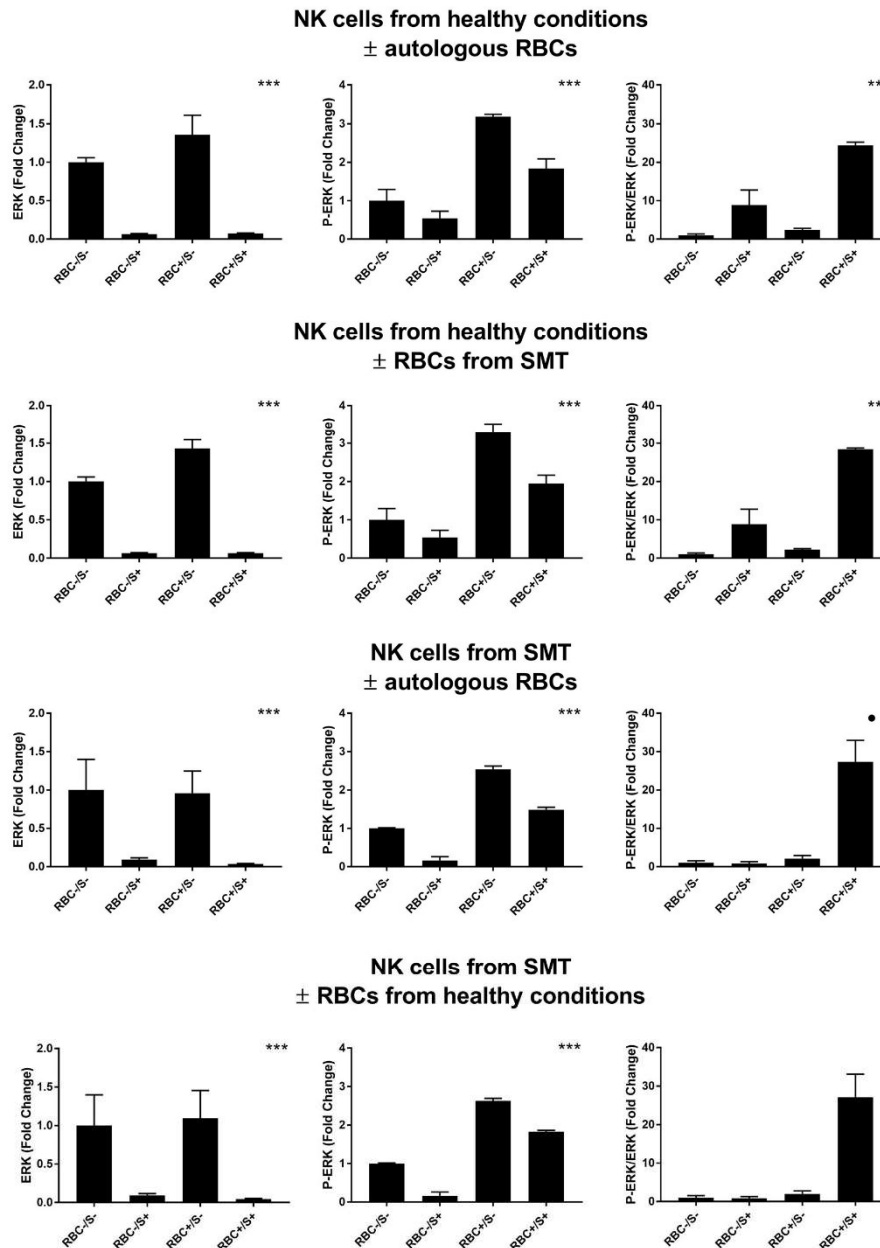
Results of Fig. 11 show that RBCs induced a significant upregulation of Foxp3 expression levels in stagnation conditions ($p < 0.001$). So for all culture or coculture systems, shaking induced markedly downregulation of Foxp3 expression levels whatever the RBCs presence or absence ($p < 0.001$).

4. Discussion

In extravascular compartments, the RBCs movement weakens relatively to the bloodstream, which notably influences the activities of neighbouring cells. Of note, it has been reported that extravascular RBCs can act endogenously as danger signals and even promote pro-tumor effects [20]. Herein, we have investigated the impact of cell movement and interplay with RBCs on IL-2-stimulated NK cells of neoplastic patients with solid malignancy given their ability to attack well-established solid tumors [28]. Thus, experiments were carried either under gentle shaking or under stagnation conditions.

One way to overcome the tumor resistance is the adequate expansion of cytotoxic effector cells with immunomodulatory cytokines, such





(caption on next page)

as IL-2, to ensure efficient lysis of tumor targets. Indeed, stimulation of NK cells with IL-2, not only increases NK cell population, but also enhances NK cells cytotoxicity [4,29]. However, it would be of great interest to focus on factors that could maintain or even accentuate the

action of IL-2 knowing that most immune cells could undergo modifications affecting their roles in tumor conditions. Thus, we demonstrated for our part that RBCs markedly promote the proliferation and survival of IL-2-stimulated NK cells in the absence of shaking condition.



Fig. 4. Effects of RBCs and shaking on ERK expression and phosphorylation in NK cells from healthy and solid malignant tumor conditions. IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls were cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs, under shaking or stagnation condition. Each histogram shows changes in ERK and p-ERK levels for the indicated group after 48 h incubation. Data are presented as mean values with standard error of mean (relative values \pm SEM). ERK and p-ERK levels in NK cells were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ERK: extracellular signal-regulated protein kinase, HC: healthy conditions, NK: natural killer cells, p-ERK: phosphorylated ERK, RBCs: red blood cells, SMT: solid malignant tumor conditions, RBC-/S-: NK cells cultured alone without shaking, RBC+/S-: NK cells cultured with RBCs without shaking, RBC-/S+: NK cells cultured alone under shaking, RBC+/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking. Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test: $***P < 0.001$. Black dots indicate significant differences highlighted between all groups using Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-test for data that were not normally distributed: $P < 0.05$.

Additionally, RBCs from healthy conditions have more effect than RBCs from cancer conditions.

The survival of NK cells is required not only for the effective eradication of target cells, but also for maintaining their activation state. It would appear that PBNKCs from neoplastic donors of the current study are somehow functionally compromised, which is often observed in tumor-infiltrating NK cells, especially due to the immunosuppressive activity of the tumor environment [30]. Nevertheless, the functional compromise of these cells depends rather on the type of tumors, metastatic or not. In fact, it has been reported that low numbers of PBNKCs expressing high levels of programmed cell death-1 (PD-1, CD279) and displaying low proliferative responses and impaired anti-tumor activity, have been detected in ovarian carcinoma [31]. In addition, PBNKCs in melanoma cell lines can favor epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [32]. In terms of prospects, it would be interesting to evaluate the levels of checkpoint receptors and molecules, as well as the induction capacity or not of EMT by PBNKCs of neoplastic patients, in both stagnation and shaking conditions. Of note, Bcl-2 and p53 have been reported to be as ones of the most important nodes in cell survival and apoptosis [33], respectively, while ERK activation has been associated with both cell survival and proliferation [34]. Also of note, it has been reported that Bcl-2 expression by NK cells [35], ERK activation [36] and p53 expression [37] can be upregulated by IL-2. Our outcomes demonstrated that stagnation leads to ERK and p-ERK upregulation in IL-2-stimulated NK cells, and promotes NK cells apoptosis. Additionally, both p53 expression and ERK phosphorylation were promoted by RBCs.

Besides their ability to kill aberrant cells, NK cells also coordinate innate and adaptive immune responses by their capacity to produce a variety of cytokines [38] including IFN- γ and TNF- α [39], that both have been demonstrated to have strong antitumor activities [40–42]. Although IFN- γ and TNF- α usually act in concert as type 1 T helper cell (Th1) cytokines [43], our results have shown that agitation has mechanistically different effects in regulating the production of these two cytokines. Thus, although agitation effects induced upregulation of TNF- α , IFN- γ was downregulated. This would suggest that cell stagnation represents a real “danger signal” for NK cells, stimulating them to produce IFN- γ . Additionally, cell movement would counteract the effects of cell stagnation or weak movement by triggering the TNF- α production in order to compensate the less of IFN- γ production.

In addition to their effector functions, NK cells can exert a regulatory role that modulate inflammatory processes through the production of the immunoregulatory cytokine IL-10 [44–46]. It has been demonstrated that freshly purified and IL-2-stimulated human PBNKCs can produce IL-10, but at low levels [47,48], which seems to be linked to a strong stimulation by IL-2 [44]. In our study, we have shown that the movement of NK cells alone or in coculture with RBCs has a remarkable effect on downregulation of IL-10 production. This would be in perfect agreement with our results mentioned above concerning the effects of cell shaking on IFN- γ production. Indeed, it has been shown that IL-10 and IFN- γ are produced simultaneously and act in concert against tumors. Together they influence the immune system although it has often been believed that they are opposing, ‘immunosuppressive’ and ‘immunostimulatory’, cytokines [49]. Likewise, in addition to our assumption about cell

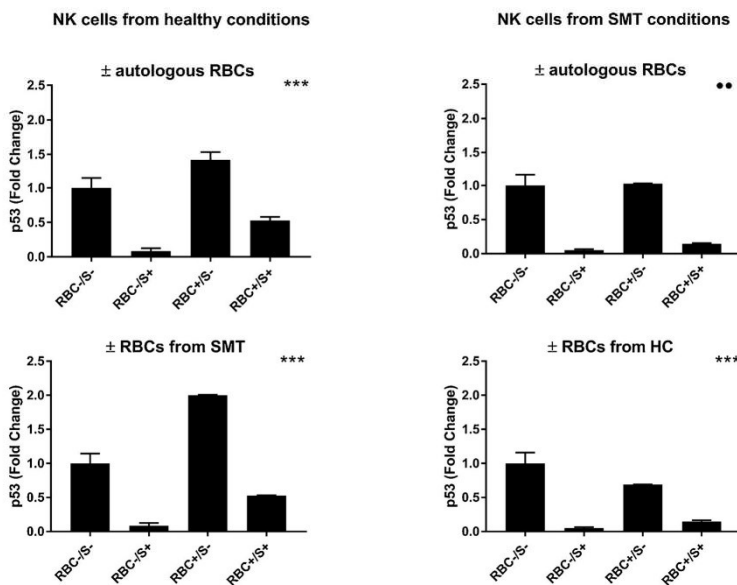


Fig. 5. Effects of RBCs and shaking on p53 expression levels in NK cells from healthy and solid malignant tumor conditions. IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls were cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs, under shaking or stagnation condition. Each histogram shows changes in p53 levels for the indicated group after 48 h incubation. Data are presented as mean values with standard error of mean (relative values \pm SEM). p53 levels in NK cells were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HC: healthy conditions, NK: natural killer cells, p53: apoptosis-related tumor suppressor protein 53, RBCs: red blood cells, SMT: solid malignant tumor conditions, RBC-/S-: NK cells cultured alone without shaking, RBC+/S-: NK cells cultured with RBCs without shaking, RBC-/S+: NK cells cultured alone under shaking, RBC+/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking. Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test: $***P < 0.001$. Black dots indicate significant differences highlighted between all groups using Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-test for data that were not normally distributed: $^*P < 0.01$.



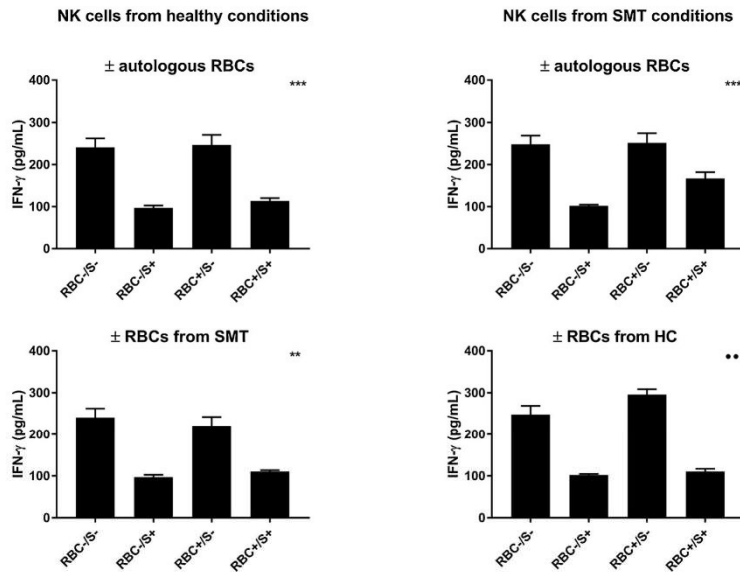


Fig. 6. Effects of RBCs and shaking on IFN- γ release by NK cells from healthy and solid malignant tumor conditions. IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls were cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs, under shaking or stagnation condition. Each histogram shows changes in IFN- γ levels for the indicated group after 48 h incubation. Data are presented as mean values with standard error of mean (SEM). IFN- γ levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HC: healthy conditions, IFN- γ : interferon gamma, NK: natural killer cells, RBCs: red blood cells, SMT: solid malignant tumor conditions, RBC-/S-: NK cells cultured alone without shaking, RBC+/S-: NK cells cultured with RBCs without shaking, RBC-/S+: NK cells cultured alone under shaking, RBC+/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking. Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$. Black dots indicate significant differences highlighted between all groups using Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-test for data that were not normally distributed: * $P < 0.01$).

stagnation and IFN- γ production, the lack of cell movement would be a determining factor in the *IL10* gene expression. Moreover, beyond cell stagnation effects, the RBC effect on IL-10 production would depend on the source of NK cells. Therefore, we have shown that RBCs induced a downregulation of IL-10 production in the medium where NK cells were derived from healthy conditions; conversely, an opposite effect has been observed when NK cells were derived from SMT conditions. So, it would be likely that the phenotypic orientation toward IL-10-producing NK cells would depend on their origin.

In the current study, a strong concentration of IL-2 allowed NK cells production of both IL-1 β and IL-6 although such cells are not considered as well-known source of these two cytokines. IL-1 β is a major pro-inflammatory cytokine, which can lead to suppression of antitumor immunity [50,51]. In our work, we have observed that IL-1 β levels could be downregulated following crosstalk between NK cells from SMT conditions and autologous or nonautologous RBCs. Therefore, the NK cells origin can be considered as a key element for IL-1 β downregulation during their interplay with RBCs. Interestingly, whatever the NK cells

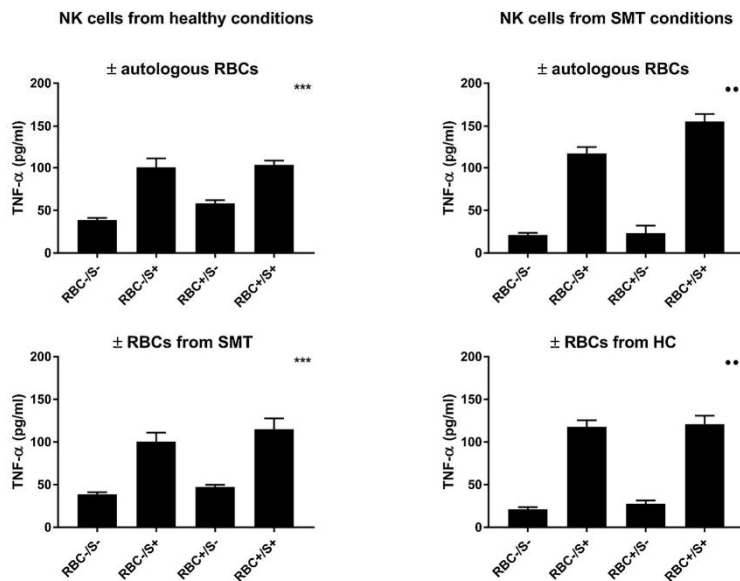


Fig. 7. Effects of RBCs and shaking on TNF- α release by NK cells from healthy and solid malignant tumor conditions. IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls were cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs, under shaking or stagnation condition. Each histogram shows changes in TNF- α levels for the indicated group after 48 h incubation. Data are presented as mean values with standard error of mean (SEM). TNF- α levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HC: healthy conditions, NK: natural killer cells, RBCs: red blood cells, SMT: solid malignant tumor conditions, TNF- α : tumor necrosis factor alpha, RBC-/S-: NK cells cultured alone without shaking, RBC+/S-: NK cells cultured with RBCs without shaking, RBC-/S+: NK cells cultured alone under shaking, RBC+/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking. Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test: *** $P < 0.001$. Black dots indicate significant differences highlighted between all groups using Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-test for data that were not normally distributed: * $P < 0.01$).



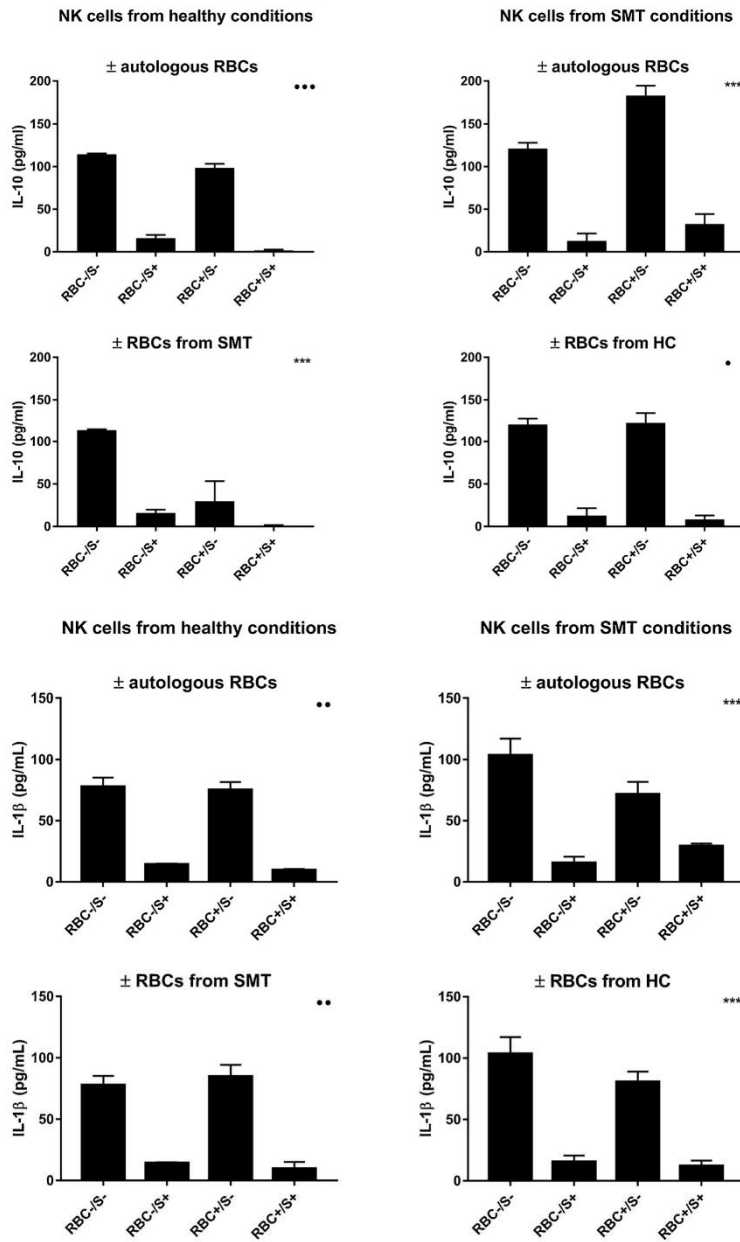


Fig. 8. Effects of RBCs and shaking on IL-10 release by NK cells from healthy and solid malignant tumor conditions. IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls were cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs, under shaking or stagnation condition. Each histogram shows changes in IL-10 levels for the indicated group after 48 h incubation. Data are presented as mean values with standard error of mean (SEM). IL-10 levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HC: healthy conditions, IL-10: interleukin 10, NK: natural killer cells, RBCs: red blood cells, SMT: solid malignant tumor conditions, RBC-/S-: NK cells cultured alone without shaking, RBC+/S-: NK cells cultured with RBCs without shaking, RBC-/S+: NK cells cultured alone under shaking, RBC+/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking. Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test: *** $P < 0.001$. Black dots indicate significant differences highlighted between all groups using Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-test for data that were not normally distributed: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

Fig. 9. Effects of RBCs and shaking on IL-1β release by NK cells in healthy and solid malignant tumor conditions. IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls were cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs, under shaking or stagnation condition. Each histogram shows changes in IL-1β levels for the indicated group after 48 h incubation. Data are presented as mean values with standard error of mean (SEM). IL-1β levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HC: healthy conditions, IL-1β: interleukin 1 beta, NK: natural killer cells, RBCs: red blood cells, SMT: solid malignant tumor conditions, RBC-/S-: NK cells cultured alone without shaking, RBC+/S-: NK cells cultured with RBCs without shaking, RBC-/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking, RBC+/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking. Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test: *** $P < 0.001$. Black dots indicate significant differences highlighted between all groups using Kruskal-Wallis test followed by Dunn post-test for data that were not normally distributed: * $P < 0.01$.

origin, shaking has markedly downregulated IL-1β levels. Therefore, this would most likely be related to the movement of cocultured cells, which could have an effect on decreasing contact levels between these two cells. So, the IL-1β release would depend on NK cells-RBCs contacts.

IL-6 is considered as one of the major cytokines that are found in the tumor microenvironment, where it can promote inhibition of NK cells

function [52]. Our findings have shown that both shaking and RBCs induced downregulation of IL-6 production in coculture of NK cells from malignant conditions with either nonautologous or autologous RBCs. Therefore, it would be necessary to check whether cell movement and RBCs would activate the same cellular signaling pathways, leading to downstream decrease of *IL6* gene expression. But, similarly to IL-1β,



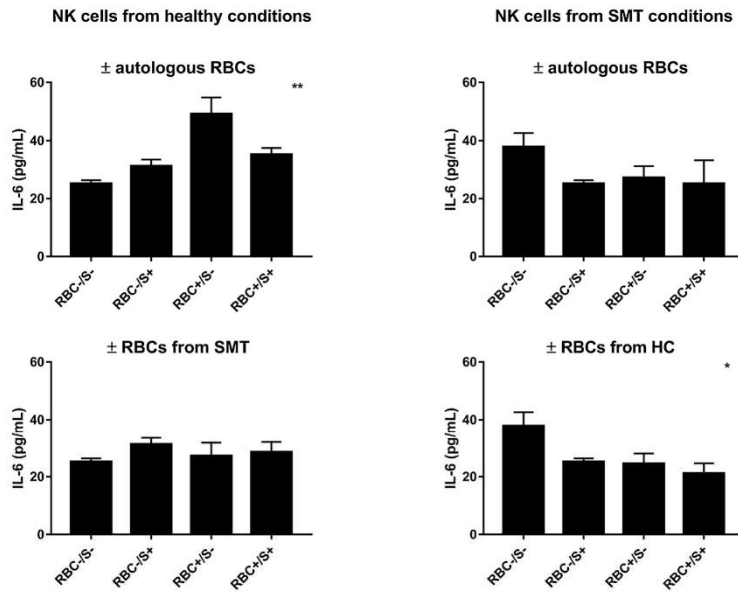


Fig. 10. Effects of RBCs and shaking on IL-6 release by NK cells from healthy and solid malignant tumor conditions. IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls were cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs, under shaking or stagnation condition. Each histogram shows changes in IL-6 levels for the indicated group after 48 h incubation. Data are presented as mean values with standard error of mean (SEM). IL-6 levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HC: healthy conditions, IL-6: interleukin 6, NK: natural killer cells, RBCs: red blood cells, SMT: solid malignant tumor conditions, RBC-/S-: NK cells cultured alone without shaking, RBC-/S+: NK cells cultured alone under shaking, RBC+/S-: NK cells cultured with RBCs without shaking, RBC+/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking. Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

the downregulation of IL-6 is observed only in NK cell cocultures originating from patients with SMT. Thus, the regulation of protumor cytokines production would require shaking or even interaction with nonautologous allogeneic RBCs.

The extrathymic Foxp3 expression is regulated by numerous factors at genetic and epigenetic levels, including histone modifications and

complete demethylation of CpG motifs which allows transcription factors binding. Additionally, IL-2 signaling plays a crucial role in Foxp3 expression and stabilization by directly targeting *FOXP3* gene through activation of transcription factors and modulation of methylating enzymes recruitment [53,54]. In contrast to CD4⁺ and some CD8⁺ regulatory T-cells (Treg), IL-2 does not induce *FOXP3* expression in NK

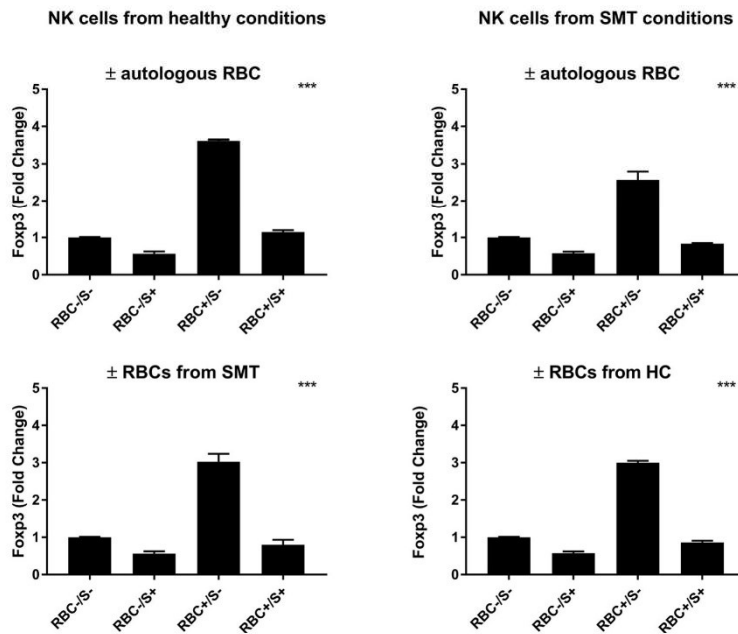


Fig. 11. Effects of RBCs and shaking on Foxp3 expression in NK cells from healthy and solid malignant tumor conditions. IL-2-stimulated NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls were cocultured or not with autologous or nonautologous RBCs, under shaking or stagnation condition. Each histogram shows changes in Foxp3 expression for the indicated group after 48 h incubation. Data are presented as mean values with standard error of mean (relative values \pm SEM). Foxp3 levels in NK cells were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Foxp3: forkhead box protein 3, HC: healthy conditions, NK: natural killer cells, RBCs: red blood cells, SMT: solid malignant tumor conditions, RBC-/S-: NK cells cultured alone without shaking, RBC-/S+: NK cells cultured with RBCs without shaking, RBC+/S-: NK cells cultured with RBCs under shaking, RBC+/S+: NK cells cultured with RBCs under shaking. Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test: *** $P < 0.001$.



cells due to its natural DNA methylation, but this expression can be restored after *in vitro* demethylation [55]. Our results have shown that IL-2-stimulated NK cells become Foxp3⁺ after their interplay with RBCs. But we still don't know if such conditions could lead to DNA demethylation in NK cells. Additionally, knowing that shaking induced a return to the initial state of Foxp3 expression levels, this would depend mainly on direct cell-cell contacts that usually result in synapse formation. Therefore, cell movement would induce a negative-feedback loop, through preventing synapses formation, not only by breaking cell connections, but also by preventing the occurrence of cell-cell interactions and synapse formation.

5. Conclusions

Our outcomes showed for the first time that cell stagnation would be markedly involved in the inhibition of NK cell activities and survival, and can be counterbalanced by cell movement. Additionally, we suggest that in cooperation with strong IL-2 signaling, RBCs and stagnation can enhance a switch of NK cells toward a regulatory phenotype-induced Foxp3. Moreover, cell movement could have a potential effect on immune cells behavior and raise important questions about cell contact between RBCs and NK cells. Furthermore, RBCs may exert a biphasic effect on IL-10 production, depending on the origin of NK cells, which would also be a determining factor in the production of IL-1β and IL-6. Finally, the present study should open the way to other investigations, in the context of translational medicine, seeking the feasibility of making reversible the mobility of NK cells infiltrating solid tumors, taking into account the culture conditions during the large scale production of activated NK cells.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to express their deepest gratitude to Drs. Ilhem Ben-Yelles and Nassima Djafour from Oral Medicine Department and the Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology (W0414100, University of Tlemcen, Algeria), and Drs. Fouad Benamara and Smain Nabil Mesli from the Surgical Department of Tlemcen Medical Centre University (Tlemcen, Algeria) for their Valuable Technical Support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.02.002>.

References

[1] M.A. Caligiuri, Human natural killer cells, *Blood* 112 (2008) 461–469, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>.
 [2] E. Vivier, D.H. Raulet, A. Moretta, M.A. Caligiuri, L. Zitvogel, L.L. Lanier, W.M. Yokoyama, S. Ugolini, Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells, *Science* 331 (2011) 44–49, <https://doi.org/10.1126/science.1198687>.
 [3] D. Cho, D. Campana, Expansion and activation of natural killer cells for Cancer immunotherapy, *Korean J. Lab. Med.* 29 (2009) 89, <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.2.89>.
 [4] R. Sharma, A. Das, IL-2 mediates NK cell proliferation but not hyperactivity, *Immunol. Res.* 66 (2018) 151–157, <https://doi.org/10.1007/s12026-017-8982-3>.
 [5] S.A. Lim, T.-J. Kim, J.E. Lee, C.H. Sonn, K. Kim, J. Kim, J.G. Choi, I.-K. Choi, C.-O. Yun, J.-H. Kim, C. Yee, V. Kumar, K.-M. Lee, Ex vivo expansion of highly cytotoxic human NK cells by cocultivation with irradiated tumor cells for adoptive immunotherapy, *Cancer Res.* 73 (2013) 2598–2607, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2893>.
 [6] A.-L. Millard, P.V. Valli, G. Stussi, N.J. Mueller, G.P. Yung, J.D. Seebach, Brief exercise increases peripheral blood NK cell counts without immediate functional changes, but impairs their responses to ex vivo stimulation, *Front. Immunol.* 4 (2013), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00125>.

[7] M. Aribi, Introductory chapter: a brief overview on natural killer cells, in: M. Aribi (Ed.), *Natural Killer Cells*, Intech, 2017, <https://doi.org/10.5772/intechopen.72328>.
 [8] D.S. Bae, J.K. Lee, Development of NK cell expansion methods using feeder cells from human myelogenous leukemia cell line, *Blood Res.* 49 (2014) 154–161, <https://doi.org/10.5045/br.2014.49.3.154>.
 [9] M. Cella, H. Miller, C. Song, N.K. Beyond, Cells: the expanding universe of innate lymphoid cells, *Front. Immunol.* 5 (2014), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00282>.
 [10] M.A. Cooper, T.A. Fehniger, M.A. Caligiuri, The biology of human natural killer-cell subsets, *Trends Immunol.* 22 (2001) 633–640.
 [11] J. Dunne, S. Lynch, C. O'Farrelly, S. Todryk, J.E. Hegarty, C. Feighery, D.G. Doherty, Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive t cells by IL-2 and IL-15, *J. Immunol.* 167 (2001) 3129–3138, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3129>.
 [12] R. Meazza, B. Azzarone, A.M. Orengo, S. Ferrini, Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 1–16, <https://doi.org/10.1155/2011/861920>.
 [13] G. Gasteiger, S. Hemmers, M.A. Firth, A. Le Floch, M. Huse, J.C. Sun, A.Y. Rudenski, IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells, *J. Exp. Med.* 210 (2013) 1167–1178, <https://doi.org/10.1084/jem.20122462>.
 [14] T.A. Fehniger, M.A. Cooper, G.J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna, M.A. Caligiuri, CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity, *Blood* 101 (2003) 3052–3057, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2876>.
 [15] T.-J. Kim, M. Kim, H.M. Kim, S.A. Lim, E.-O. Kim, K. Kim, K.H. Song, J. Kim, V. Kumar, C. Yee, J. Doh, K.-M. Lee, Homotypic NK cell-to-cell communication controls cytokine responsiveness of innate immune NK cells, *Sci. Rep.* 4 (2015), <https://doi.org/10.1038/srep07157>.
 [16] D.A. Bizjak, C. Brinkmann, W. Bloch, M. Grau, Increase in red blood cell-nitric oxide synthase dependent nitric oxide production during red blood cell aging in health and disease: a study on age dependent changes of rheologic and enzymatic properties in red blood cells, *PLoS One* 10 (2015) e0125206, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125206>.
 [17] A.V. Gothoskar, Resealed Erythrocytes: A Review, (n.d.) 12.
 [18] P. Sánchez-Rodríguez, M.C. Rodríguez, J. Sánchez-Yagüe, Identification of potential erythrocyte phospholipid fatty acid biomarkers of advanced lung adenocarcinoma, squamous cell lung carcinoma, and small cell lung cancer, *Tumor Biol.* 36 (2015) 5687–5698, <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3243-3>.
 [19] J. de Castro, Md, M.C. Rodríguez, V.S. Martínez-Zorzano, P. Sánchez-Rodríguez, J. Sánchez-Yagüe, Erythrocyte Fatty Acids as Potential Biomarkers in the Diagnosis of Advanced Lung Adenocarcinoma, Lung Squamous Cell Carcinoma, and Small Cell Lung Cancer, *Am. J. Clin. Pathol.* 142 (2014) 111–120, <https://doi.org/10.1309/AJCP1QUQLLTSBLL>.
 [20] T. Yin, S. He, X. Liu, W. Jiang, T. Ye, Z. Lin, Y. Sang, C. Su, Y. Wan, G. Shen, X. Ma, M. Yu, F. Guo, Y. Liu, L. Li, Q. Hu, Y. Wang, Y. Wei, Extravascular red blood cells and hemoglobin promote tumor growth and therapeutic resistance as endogenous danger signals, *J. Immunol.* 194 (2015) 429–437, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400643>.
 [21] B. Buttari, E. Profumo, R. Riganò, Crosstalk between red blood cells and the immune system and its impact on atherosclerosis, *Biomed. Res. Int.* 2015 (2015) 1–8, <https://doi.org/10.1155/2015/616834>.
 [22] H. Sauri, P.H. Ashjian, A.T. Kim, H. Shau, Recombinant natural killer enhancing factor augments natural killer cytotoxicity, *J. Leukoc. Biol.* 59 (1996) 925–931.
 [23] H. Shau, A. Kim, Identification of natural killer enhancing factor as a major antioxidant in human red blood cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994) 83–88.
 [24] J. Dupire, M. Socol, A. Viallat, Full dynamics of a red blood cell in shear flow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 20808–20813, <https://doi.org/10.1073/pnas.1210236109>.
 [25] M. Benjamin, B. Hillen, Mechanical influences on cells, tissues and organs - "Mechanical Morphogenesis", *Eur. J. Morphol.* 41 (2003) 3–7, <https://doi.org/10.1076/ejom.41.1.3.28102>.
 [26] R.W. Childs, M. Berg, Bringing natural killer cells to the clinic: ex vivo manipulation, *Hematology* 2013 (2013) 234–246, <https://doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.234>.
 [27] H. Shau, S.H. Golub, Modulation of natural killer-mediated lysis by red blood cells, *Cell. Immunol.* 116 (1988) 60–72, [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(88\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0008-8749(88)90210-9).
 [28] S.K. Larsen, Y. Gao, P.H. Basse, NK cells in the tumor microenvironment, *Crit. Rev. Oncog.* 19 (2014) 91–105.
 [29] A. Cuapio, M. Post, S. Cerny-Reiterer, K.V. Gleixner, G. Stefanzi, J. Basilio, S. Herndlhofer, W.R. Sperr, N.H.C. Brons, E. Casanova, J. Zimmer, P. Valent, E. Hofer, Maintenance therapy with histamine plus IL-2 induces a striking expansion of two CD56^{bright} NK cell subpopulations in patients with acute myeloid leukemia and supports their activation, *Oncotarget* 7 (2016), <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10191>.
 [30] M.C. Burger, C. Zhang, P.N. Harter, A. Romanski, F. Strassheimer, C. Senft, T. Tonn, J.P. Steinbach, W.S. Wels, CAR-engineered NK cells for the treatment of glioblastoma: turning innate effectors into precision tools for Cancer immunotherapy, *Front. Immunol.* 10 (2019) 2683, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02683>.
 [31] S. Pesce, M. Greppi, G. Tabellini, F. Rampinelli, S. Parolini, D. Olive, L. Moretta, A. Moretta, E. Marcenaro, Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: a phenotypic and functional



- characterization, *J. Allergy Clin. Immunol.* 139 (2017) 335–346, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.025> e3.
- [32] L. Huergo-Zápico, M. Parodi, C. Cantoni, C. Lavarello, J.L. Fernández-Martínez, A. Petretto, E.J. DeAndrés-Galiana, M. Balsamo, A. López-Soto, G. Pietra, M. Bugatti, E. Munari, M. Marconi, M.C. Mingari, W. Vermi, L. Moretta, S. González, M. Vitale, NK-cell editing mediates epithelial-to-Mesenchymal transition via phenotypic and proteomic changes in melanoma cell lines, *Cancer Res.* 78 (2018) 3913–3925, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1891>.
- [33] R. Pan, V. Ruvolo, H. Mu, J.D. Levenson, G. Nichols, J.C. Reed, M. Konopleva, M. Andreeff, Synthetic lethality of combined Bcl-2 inhibition and p53 activation in AML: mechanisms and superior antileukemic efficacy, *Cancer Cell* 32 (2017) 748–760, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.11.003> e6.
- [34] Y. Mebratu, Y. Tesfaiagi, How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8 (2009) 1168–1175, <https://doi.org/10.4161/cc.8.8.8147>.
- [35] S. Jiang, R. Munker, M. Andreeff, Bcl-2 is expressed in human natural killer cells and is regulated by interleukin-2, *Nat. Immun.* 15 (1996) 312–317.
- [36] T.-K. Yu, E.G. Caudell, C. Smid, E.A. Grimm, IL-2 activation of NK cells: involvement of MKK1/2/ERK but not p38 kinase pathway, *J. Immunol.* 164 (2000) 6244–6251, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6244>.
- [37] T. Mahdi, J. Tanzer, A. Brizard, F. Guilhot, P. Babin, A. Kitzis, Cell-mediated cytotoxicity can be regulated by p53 tumor suppressor gene activity in vitro, *Biol. Cell* 84 (1995) 175–185, [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(96\)89427-5](https://doi.org/10.1016/0248-4900(96)89427-5).
- [38] A.Y. Mah, M.A. Cooper, Metabolic regulation of natural killer cell IFN- γ production, *Crit. Rev. Immunol.* 36 (2016) 131–147, <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2016017387>.
- [39] C. Fauriat, E.O. Long, H.-G. Ljunggren, Y.T. Bryceson, Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition, *Blood* 115 (2010) 2167–2176, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-238469>.
- [40] B.B. Aggarwal, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 745–756, <https://doi.org/10.1038/nri1184>.
- [41] S. Mocellin, C.R. Rossi, P. Pilati, D. Nitti, Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy, *Cytokine Growth Factor Rev.* 16 (2005) 35–53, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.11.001>.
- [42] F. Salerno, A. Guislain, J.J. Freen-Van Heeren, B.P. Nicolet, H.A. Young, M.C. Walkers, Critical role of post-transcriptional regulation for IFN- γ in tumor-infiltrating T cells, *Oncoimmunology* 8 (2019) e1532762, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1532762>.
- [43] L.E. Showalter, C. Oechsle, N. Ghimirey, C. Steele, B.J. Czerniecki, G.K. Koski, Th1 cytokines sensitize HER-expressing breast cancer cells to lapatinib, *PLoS One* 14 (2019) e0210209, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210209>.
- [44] E. Vivier, S. Ugolini, Regulatory natural killer cells: new players in the IL-10 anti-inflammatory response, *Cell Host Microbe* 6 (2009) 493–495, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.12.001>.
- [45] M.L. Tarrío, S.-H. Lee, M.F. Fragoso, H.-W. Sun, Y. Kanno, J.J. O'Shea, C.A. Biron, Proliferation conditions promote intrinsic changes in NK cells for an IL-10 response, *J.I.* 193 (2014) 354–363, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302999>.
- [46] R.P. Donnelly, R.M. Loftus, S.E. Keating, K.T. Liou, C.A. Biron, C.M. Gardiner, D.K. Finlay, mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Is a Prerequisite for NK Cell Effector Function, *J. Immunol.* 193 (2014) 4477–4484, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401558>.
- [47] P.T. Mehrotra, R.P. Donnelly, S. Wong, A. Geremew, H.S. Mostowski, J.P. Siegel, E. T. Bloom, Production of IL-10 by Human Natural Killer Cells Stimulated with IL-2 and/or IL-12, (n.d.) 9.
- [48] S.-H. Lee, K.-S. Kim, N. Fodil-Cornu, S.M. Vidal, C.A. Biron, Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 2235–2251, <https://doi.org/10.1084/jem.20082387>.
- [49] Y. Yanagawa, K. Iwabuchi, K. Onoé, Co-operative action of interleukin-10 and interferon-gamma to regulate dendritic cell functions, *Immunology* 127 (2009) 345–353, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02986.x>.
- [50] A. Mantovani, I. Barajon, C. Garlanda, IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy, *Immunol. Rev.* 281 (2018) 57–61, <https://doi.org/10.1111/imr.12614>.
- [51] A. Litmanovich, K. Khazim, I. Cohen, The role of Interleukin-1 in the pathogenesis of Cancer and its potential as a therapeutic target in clinical practice, *Oncol. Ther.* 6 (2018) 109–127, <https://doi.org/10.1007/s40487-018-0089-z>.
- [52] M.Y. Taher, D.M. Davies, J. Maher, The role of the interleukin (IL)-6/IL-6 receptor axis in cancer, *Biochim. Soc. Trans.* 46 (2018) 1449–1462, <https://doi.org/10.1042/BST20180136>.
- [53] C.H. Kim, FOXP3 and its role in the immune system, in: K. Maiese (Ed.), *Forkhead Transcription Factors*, Springer, New York, New York, NY, 2009, pp. 17–29, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1599-3_2.
- [54] K. Freudenberg, N. Lindner, S. Dohnke, A.I. Garbe, S. Schallenberg, K. Kretschmer, Critical role of TGF- β and IL-2 receptor signaling in Foxp3 induction by an inhibitor of DNA methylation, *Front. Immunol.* 9 (2018) 125, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00125>.
- [55] E. Zorn, E.A. Nelson, M. Mohseni, F. Porcheray, H. Kim, D. Litsa, R. Bellucci, E. Raderschall, C. Canning, R.J. Soiffer, D.A. Frank, J. Ritz, IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+ CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo, *Blood* 108 (2006) 1571–1579, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-004747>.

CHAPITRE 3

Chapitre 3. Conclusions et perspectives

Nos résultats ont montré pour la première fois que la stagnation cellulaire serait fortement impliquée dans l'inhibition des activités des cellules NK et de l'apoptose, et dans la production de TNF- α . Le mouvement cellulaire peut être l'une des approches thérapeutiques potentielles les plus importantes pour stimuler les activités de ces cellules pendant le cancer solide, ainsi que pour la régulation négative de la production d'IL-1 β . Par ailleurs, les globules rouges ont montré leur capacité à induire non seulement la libération d'IL-1 β , mais aussi un changement de cellules NK stimulées par IL-2 vers un phénotype régulateur induit à Foxp3; un tel effet est contrecarré par une agitation / un mouvement cellulaire, où la production de la cytokine immunosuppressive IL-10 est régulée à la baisse. Le mouvement effectué par une agitation constante des cellules empêcherait leur contact intime, et probablement leur répulsion, ainsi que l'expression à la fois de l'IL-10 et du Foxp3. Par conséquent, nous pouvons suggérer qu'en coopération avec une forte signalisation d'IL-2, les globules rouges et la stagnation peuvent induire une activité immunosuppressive chez les cellules NK. Néanmoins, les globules rouges peuvent exercer un effet biphasique sur la production d'IL-10, selon l'origine des cellules NK. Ainsi, la production d'IL-10 peut être régulée à la baisse ou à la hausse lorsque les cellules NK sont dérivées de conditions saines ou, inversement, de conditions de tumeurs malignes solides, respectivement. L'origine des cellules NK serait également un facteur déterminant dans la production d'IL-1 β et d'IL-6. In fine, les données obtenues dans ce travail révèlent que le mouvement cellulaire pourrait avoir un effet potentiel sur le comportement des cellules immunitaires et nous conduit à poser des questions importantes sur le contact cellulaire entre les érythrocytes et les cellules NK. Il sera donc nécessaire de déterminer si la modification des activités fonctionnelles des cellules NK aura lieu en amont ou en aval de l'installation clinique d'une tumeur solide donnée. Cette étude devrait aussi ouvrir la voie à d'autres investigations, dans le contexte de la médecine translationnelle, en cherchant la faisabilité de rendre réversible la mobilité des cellules NK infiltrant des tumeurs solides, en tenant compte des conditions de culture lors de la production à grande échelle de cellules NK activées.

CHAPITRE 4

Chapitre 4. Bibliographie

A

Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S., Malarkannan, S., 2018. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 9, 1869. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>

Aguirre-Ghiso, J.A., 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer* 7, 834–846.

Anderson, H.L., Brodsky, I.E., Mangalmurti, N.S., 2018. The Evolving Erythrocyte: Red Blood Cells as Modulators of Innate Immunity. *J. Immunol.* 201, 1343–1351. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800565>

Andersson, G., Cuijpers, P., 2009. Internet-based and other computerized psychological treatments for adult depression: a meta-analysis. *Cogn Behav Ther* 38, 196–205. <https://doi.org/10.1080/16506070903318960>

Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagné, F., Ugolini, S., Vivier, E., 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.013>

Antunes, R.F., Brandão, C., Maia, M., Arosa, F.A., 2011. Red blood cells release factors with growth and survival bioactivities for normal and leukemic T cells. *Immunol Cell Biol* 89, 111–121. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.60>

Aribi, M., 2017. Introductory Chapter: A Brief Overview on Natural Killer Cells, in: Aribi, M. (Ed.), *Natural Killer Cells*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72328>

B

Bae, D.S., Lee, J.K., 2014. Development of NK cell expansion methods using feeder cells from human myelogenous leukemia cell line. *Blood Research* 49, 154. <https://doi.org/10.5045/br.2014.49.3.154>

- Barach, Y.S., Lee, J.S., Zang, X., 2011. T cell coinhibition in prostate cancer: new immune evasion pathways and emerging therapeutics. *Trends in molecular medicine* 17, 47–55.
- Barbosa, A., Sousa, L., Nolan, M., Figueiredo, D., 2015. Effects of Person-Centered Care Approaches to Dementia Care on Staff: A Systematic Review. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 30, 713–722. <https://doi.org/10.1177/1533317513520213>
- Barsoum, I.B., Hamilton, T.K., Li, X., Cotechini, T., Miles, E.A., Siemens, D.R., Graham, C.H., 2011. Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide. *Cancer research* 71, 7433–7441.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Spies, T., 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727–729.
- Baum, J., Ward, R.H., Conway, D.J., 2002. Natural selection on the erythrocyte surface. *Molecular biology and evolution* 19, 223–229.
- Baume, D.M., Robertson, M.J., Levine, H., Manley, T.J., Schow, P.W., Ritz, J., 1992. Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 22, 1–6. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220102>
- Bellone, M., Calcinotto, A., Filipazzi, P., De Milito, A., Fais, S., Rivoltini, L., 2013. The acidity of the tumor microenvironment is a mechanism of immune escape that can be overcome by proton pump inhibitors. *Oncoimmunology* 2, e22058.
- Benjamin, M., Hillen, B., 2003. Mechanical Influences on Cells, Tissues and Organs ? ?Mechanical Morphogenesis? *European Journal of Morphology* 41, 3–7. <https://doi.org/10.1076/ejom.41.1.3.28102>
- Berman, J., 2005. Modern classification of neoplasms: reconciling differences between morphologic and molecular approaches. *BMC Cancer* 5, 100. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-100>
- Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., De Rosa, S.C., Douek, D.C., Roederer, M., Koup, R.A., 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a

- flow cytometric assay for degranulation. *Journal of immunological methods* 281, 65–78.
- Bhatia, A., Kumar, Y., 2015. Cancer Immunoediting: Immunosurveillance, Immune Equilibrium, and Immune Escape, in: Rezaei, N. (Ed.), *Cancer Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 195–208. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44006-3_12
- Bizjak, D.A., Brinkmann, C., Bloch, W., Grau, M., 2015. Increase in Red Blood Cell-Nitric Oxide Synthase Dependent Nitric Oxide Production during Red Blood Cell Aging in Health and Disease: A Study on Age Dependent Changes of Rheologic and Enzymatic Properties in Red Blood Cells. *PLOS ONE* 10, e0125206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125206>
- Boissel, L., Tuncer, H.H., Betancur, M., Wolfberg, A., Klingemann, H., 2008. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14, 1031–1038. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.06.016>
- Bøyum, A., 1976. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol. Suppl* 5, 9–15.
- Briercheck, E.L., Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2010. Human natural killer cell development, in: *Natural Killer Cells*. Elsevier, pp. 113–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370454-2.00008-9>
- Burnet, M., 1957. Cancer--A Biological Approach: I. The Processes Of Control. II. The Significance of Somatic Mutation. *BMJ* 1, 779–786. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5022.779>
- Buttari, B., Profumo, E., Riganò, R., 2015. Crosstalk between Red Blood Cells and the Immune System and Its Impact on Atherosclerosis. *BioMed Research International* 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/616834>
- C
- Caligiuri, M.A., 2008. Human natural killer cells. *Blood* 112, 461–469. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>

- Campbell, K.S., Hasegawa, J., 2013. Natural killer cell biology: an update and future directions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132, 536–544.
- Carrega, P., Ferlazzo, G., 2012. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front. Immun.* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00347>
- Carswell, K.S., Papoutsakis, E.T., 2000. Culture of human T cells in stirred bioreactors for cellular immunotherapy applications: shear, proliferation, and the IL-2 receptor. *Biotechnol. Bioeng.* 68, 328–338. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(20000505\)68:3<328::aid-bit11>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(20000505)68:3<328::aid-bit11>3.0.co;2-v)
- Castillo, R., Rodrigo, R., Perez, F., Cereceda, M., Asenjo, R., Zamorano, J., Navarrete, R., Villalabeitia, E., Sanz, J., Baeza, C., Aguayo, R., 2011. Antioxidant therapy reduces oxidative and inflammatory tissue damage in patients subjected to cardiac surgery with extracorporeal circulation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 108, 256–262. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00651.x>
- Cella, M., Miller, H., Song, C., 2014. Beyond NK Cells: The Expanding Universe of Innate Lymphoid Cells. *Frontiers in Immunology* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00282>
- Chambers, A.M., Lupo, K.B., Matosevic, S., 2018. Tumor Microenvironment-Induced Immunometabolic Reprogramming of Natural Killer Cells. *Front Immunol* 9, 2517. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02517>
- Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M., Vivier, E., 2018. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* 18, 671–688.
- Cho, D., Campana, D., 2009. Expansion and Activation of Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *The Korean Journal of Laboratory Medicine* 29, 89. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.2.89>
- Choucair, K., Duff, J.R., Cassidy, C.S., Albrethsen, M.T., Kelso, J.D., Lenhard, A., Staats, H., Patel, R., Brunicardi, F.C., Dworkin, L., Nemunaitis, J., 2019. Natural killer cells: a review of biology, therapeutic potential and challenges in treatment of solid tumors. *Future Oncology* 15, 3053–3069. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0116>

- Cooper, Megan A, Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 22, 633–640. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9)
- Cooper, Megan A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., Caligiuri, M.A., 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 97, 3146–3151.
- Cooper, M. A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., Caligiuri, M.A., 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146–3151. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.10.3146>
- Crowder, R.N., El-Deiry, W.S., 2012. Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. *Experimental oncology*.
- D
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004. Cell Death. *Cell* 116, 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7)
- Darbonne, W.C., Rice, G.C., Mohler, M.A., Apple, T., Hébert, C.A., Valente, A.J., Baker, J.B., 1991. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *The Journal of clinical investigation* 88, 1362–1369.
- de Back, D.Z., Kostova, E.B., van Kraaij, M., van den Berg, T.K., Van Bruggen, R., 2014. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Frontiers in physiology* 5, 9.
- de Castro, J., Md, Rodríguez, M.C., Martínez-Zorzano, V.S., Sánchez-Rodríguez, P., Sánchez-Yagüe, J., 2014. Erythrocyte Fatty Acids as Potential Biomarkers in the Diagnosis of Advanced Lung Adenocarcinoma, Lung Squamous Cell Carcinoma, and Small Cell Lung Cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 142, 111–120. <https://doi.org/10.1309/AJCP1QUQQLLT8BLI>

- Denman, C.J., Senyukov, V.V., Somanchi, S.S., Phatarpekar, P.V., Kopp, L.M., Johnson, J.L., Singh, H., Hurton, L., Maiti, S.N., Huls, M.H., 2012. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PloS one* 7.
- Di Santo, J.P., 2006. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 257–286. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090700>
- Diagnostic and therapeutic technology assessment. Bone marrow transplantation in childhood leukemia, 1984. . *JAMA* 251, 2155.
- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., Schreiber, R.D., 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity* 1, 447–456.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2004. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21, 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
- Dunne, J., Lynch, S., O’Farrelly, C., Todryk, S., Hegarty, J.E., Feighery, C., Doherty, D.G., 2001. Selective Expansion and Partial Activation of Human NK Cells and NK Receptor-Positive T Cells by IL-2 and IL-15. *The Journal of Immunology* 167, 3129–3138. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3129>
- Dupire, J., Socol, M., Viallat, A., 2012. Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 20808–20813. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210236109>
- Dusenbery, K.E., Carlson, J.W., LaPorte, R.M., Unger, J.A., Goswitz, J.J., Roback, D.M., Fowler, J.M., Adcock, L.L., Carson, L.F., Potish, R.A., 1994. Radical vulvectomy with postoperative irradiation for vulvar cancer: therapeutic implications of a central block. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29, 989–998. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(94\)90393-x](https://doi.org/10.1016/0360-3016(94)90393-x)

E

Ehrlich, P., 1908. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung.

F

Facciabene, A., Motz, G.T., Coukos, G., 2012. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer research* 72, 2162–2171.

Farag, S.S., Fehniger, T.A., Ruggeri, L., Velardi, A., Caligiuri, M.A., 2002. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 100, 1935–1947.

Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., Bryceson, Y.T., 2010. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167–2176. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-238469>

Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., Caligiuri, M.A., 2003. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101, 3052–3057. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2876>

Felices, M., Lenvik, T.R., Davis, Z.B., Miller, J.S., Vallera, D.A., 2016. Generation of BiKEs and TriKEs to Improve NK Cell-Mediated Targeting of Tumor Cells, in: Somanchi, S.S. (Ed.), *Natural Killer Cells, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 333–346. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3684-7_28

Fredriksson, K., 2003. Red blood cells stimulate human lung fibroblasts to secrete interleukin-8. *Inflammation* 27, 71–78. <https://doi.org/10.1023/A:1023274532456>

Fredriksson, K., Liu, X.D., Lundahl, J., Klominek, J., Rennard, S.I., Skold, C.M., 2006. Red blood cells increase secretion of matrix metalloproteinases from human lung fibroblasts in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 290, L326–L333. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00057.2005>

Fredriksson, K., Stridh, H., Lundahl, J., Rennard, S.I., Skold, C.M., 2004. Red Blood Cells Inhibit Proliferation and Stimulate Apoptosis in Human Lung Fibroblasts In Vitro. *Scand J Immunol* 59, 559–565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2004.01433.x>

- Freeman, B.E., Raué, H.-P., Hill, A.B., Slifka, M.K., 2015. Cytokine-mediated activation of NK cells during viral infection. *Journal of virology* 89, 7922–7931.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* 192, 1027–1034.
- Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2006. Human natural killer cell development. *Immunol. Rev.* 214, 56–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x>
- Fridman, W.H., 2018. From Cancer Immune Surveillance to Cancer Immunoediting: Birth of Modern Immuno-Oncology. *J.I.* 201, 825–826. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800827>
- Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W.H., Campana, D., 2009. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res.* 69, 4010–4017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3712>
- Fukuma, N., Akimitsu, N., Hamamoto, H., Kusuhara, H., Sugiyama, Y., Sekimizu, K., 2003. A role of the Duffy antigen for the maintenance of plasma chemokine concentrations. *Biochemical and biophysical research communications* 303, 137–139.
- G
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., Garrido, F., 2003. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of cellular physiology* 195, 346–355.
- Gasteiger, G., Hemmers, S., Firth, M.A., Le Floc’h, A., Huse, M., Sun, J.C., Rudensky, A.Y., 2013. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 1167–1178. <https://doi.org/10.1084/jem.20122462>
- Geller, M.A., Cooley, S., Judson, P.L., Ghebre, R., Carson, L.F., Argenta, P.A., Jonson, A.L., Panoskaltsis-Mortari, A., Curtsinger, J., McKenna, D., Dusenbery, K., Bliss, R., Downs, L.S., Miller, J.S., 2011. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat

patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* 13, 98–107.
<https://doi.org/10.3109/14653249.2010.515582>

Gothoskar, A.V., n.d. Resealed Erythrocytes: A Review 12.

Goyos, A., Fort, M., Sharma, A., Lebrec, H., 2019. Current Concepts in Natural Killer Cell Biology and Application to Drug Safety Assessments. *Toxicological Sciences* 170, 10–19. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz098>

Greenwalt, T.J., Gajewski, M., McKENNA, J.L., 1962. A new method for preparing buffy coat-poor blood. *Transfusion* 2, 221–229. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.1962.tb00228.x>

Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.R., Raulet, D.H., 2008. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28, 571–580.

Guicciardi, M.E., Gores, G.J., 2009. Life and death by death receptors. *The FASEB Journal* 23, 1625–1637.

Guillerey, C., Huntington, N.D., Smyth, M.J., 2016. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nature immunology* 17, 1025.

Gwalani, L.A., Orange, J.S., 2018. Single degranulations in NK cells can mediate target cell killing. *The Journal of Immunology* 200, 3231–3243.

H

Hamidi, M., Tajerzadeh, H., 2003. Carrier Erythrocytes: An Overview. *Drug Delivery* 10, 9–20. <https://doi.org/10.1080/713840329>

Hao, K., Hanawa, H., Ding, L., Ota, Y., Yoshida, K., Toba, K., Ogura, M., Ito, H., Kodama, M., Aizawa, Y., 2011. Free heme is a danger signal inducing expression of proinflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts. *Molecular immunology* 48, 1191–1202.

- Hao, N.-B., Lü, M.-H., Fan, Y.-H., Cao, Y.-L., Zhang, Z.-R., Yang, S.-M., 2012. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clinical and Developmental Immunology* 2012.
- Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., Lavrin, D.H., 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer* 16, 230–239. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910160205>
- Hod, E.A., Zhang, N., Sokol, S.A., Wojczyk, B.S., Francis, R.O., Ansaldi, D., Francis, K.P., Della-Latta, P., Whittier, S., Sheth, S., 2010. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 115, 4284–4292.
- Hodgins, J.J., Khan, S.T., Park, M.M., Auer, R.C., Ardolino, M., 2019. Killers 2.0: NK cell therapies at the forefront of cancer control. *Journal of Clinical Investigation* 129, 3499–3510. <https://doi.org/10.1172/JCI129338>
- Höglund, P., Brodin, P., 2010. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol* 10, 724–734. <https://doi.org/10.1038/nri2835>
- Hotz, M.J., Qing, D., Shashaty, M.G., Zhang, P., Faust, H., Sondheimer, N., Rivella, S., Worthen, G.S., Mangalmurti, N.S., 2018. Red blood cells homeostatically bind mitochondrial DNA through TLR9 to maintain quiescence and to prevent lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 197, 470–480.
- J
- Johnston, C.S., Meyer, C.G., Srilakshmi, J.C., 1993. Vitamin C elevates red blood cell glutathione in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 103–105. <https://doi.org/10.1093/ajcn/58.1.103>
- Jones, J.A., Casey, R.C., Karouia, F., 2010. Ionizing Radiation as a Carcinogen*, in: *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, pp. 181–228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01411-1>

K

- Kabanova, S., Kleinbongard, P., Volkmer, J., Andrée, B., Kelm, M., Jax, T.W., 2009. Gene expression analysis of human red blood cells. *International Journal of Medical Sciences* 156–159. <https://doi.org/10.7150/ijms.6.156>
- Kakhniashvili, D.G., Bulla, L.A., Goodman, S.R., 2004. The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* 3, 501–509. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300132-MCP200>
- Kanda, A., Adachi, T., Kayaba, H., Yamada, Y., Ueki, S., Yamaguchi, K., Hamada, K., Fujita, M., Chihara, J., 2004. Red blood cells regulate eosinophil chemotaxis by scavenging RANTES secreted from endothelial cells. *Clin Exp Allergy* 34, 1621–1626. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02073.x>
- Karsten, E., Breen, E., McCracken, S.A., Clarke, S., Herbert, B.R., 2020. Red blood cells exposed to cancer cells in culture have altered cytokine profiles and immune function. *Sci Rep* 10, 7727. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64319-3>
- Khandelwal, S., van Rooijen, N., Saxena, R.K., 2007. Reduced expression of CD47 during murine red blood cell (RBC) senescence and its role in RBC clearance from the circulation. *Transfusion* 47, 1725–1732. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01348.x>
- Khong, H.T., Restifo, N.P., 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 3, 999–1005. <https://doi.org/10.1038/ni1102-999>
- Khosravi-Far, R., 2004. Death receptor signals to the mitochondria. *Cancer biology & therapy* 3, 1051–1057.
- Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., 1975a. “Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5, 112–117. <https://doi.org/10.1002/eji.1830050208>

- Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., 1975b. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5, 112–117. <https://doi.org/10.1002/eji.1830050208>
- Kim Juyoung, Hyung Jin Nam, Sang Hyun Lee, Jong Beom Ku, Seung Ryel Han, Hye Jin Shin, Yu Kyeong Hwang, and Sang Hoon Paik, "Scale-up study for ex-vivo expansion of allogeneic natural killer cells in stirred-tank bioreactor" in "Advancing Manufacture of Cell and Gene Therapies VI", Dolores Baksh, GE Healthcare, USA Rod Rietze, Novartis, USA Ivan Wall, Aston University, United Kingdom Eds, ECI Symposium Series, (2019). https://dc.engconfintl.org/cell_gene_therapies_vi/51
- Kim, S.-H., Kim, E.-J., Hou, J.-H., Kim, J.-M., Choi, H.-G., Shim, C.-K., Oh, Y.-K., 2009. Oposonized erythrocyte ghosts for liver-targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotides. *Biomaterials* 30, 959–967. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.031>
- Kim, T.-J., Kim, M., Kim, H.M., Lim, S.A., Kim, E.-O., Kim, K., Song, K.H., Kim, J., Kumar, V., Yee, C., Doh, J., Lee, K.-M., 2015. Homotypic NK cell-to-cell communication controls cytokine responsiveness of innate immune NK cells. *Scientific Reports* 4. <https://doi.org/10.1038/srep07157>
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., Schreiber, R.D., 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903–907. <https://doi.org/10.1038/nature06309>
- L
- Langers, I., Renoux, V.M., Thiry, M., Delvenne, P., Jacobs, N., 2012. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics: targets & therapy* 6, 73.
- Lee, D.A., Verneris, M.R., Campana, D., 2010. Acquisition, preparation, and functional assessment of human NK cells for adoptive immunotherapy, in: *Immunotherapy of Cancer*. Springer, pp. 61–77.
- Lee, J.S., Wurfel, M.M., Matute-Bello, G., Frevert, C.W., Rosengart, M.R., Ranganathan, M., Wong, V.W., Holden, T., Sutlief, S., Richmond, A., 2006. The Duffy antigen modifies

systemic and local tissue chemokine responses following lipopolysaccharide stimulation. *The Journal of Immunology* 177, 8086–8094.

Li, J., Dao, M., Lim, C.T., Suresh, S., 2005. Spectrin-Level Modeling of the Cytoskeleton and Optical Tweezers Stretching of the Erythrocyte. *Biophysical Journal* 88, 3707–3719. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047332>

Li, J., Lykotrafitis, G., Dao, M., Suresh, S., 2007. Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 4937–4942. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700257104>

Li, Y., Hermanson, D.L., Moriarity, B.S., Kaufman, D.S., 2018. Human iPSC-derived natural killer cells engineered with chimeric antigen receptors enhance anti-tumor activity. *Cell stem cell* 23, 181–192.

Lim, S.A., Kim, T.-J., Lee, J.E., Sonn, C.H., Kim, K., Kim, J., Choi, J.G., Choi, I.-K., Yun, C.-O., Kim, J.-H., Yee, C., Kumar, V., Lee, K.-M., 2013. Ex Vivo Expansion of Highly Cytotoxic Human NK Cells by Cocultivation with Irradiated Tumor Cells for Adoptive Immunotherapy. *Cancer Research* 73, 2598–2607. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2893>

M

Malmberg, K.-J., Carlsten, M., Björklund, A., Sohlberg, E., Bryceson, Y.T., Ljunggren, H.-G., 2017. Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer, in: *Seminars in Immunology*. Elsevier, pp. 20–29.

Malnati, M.S., Lusso, P., Ciccone, E., Moretta, A., Moretta, L., Long, E.O., 1993. Recognition of virus-infected cells by natural killer cell clones is controlled by polymorphic target cell elements. *The Journal of experimental medicine* 178, 961–969.

Mamessier, E., Sylvain, A., Thibault, M.-L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., Gonçalves, A., André, P., Romagné, F., Thibault, G., 2011. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *The Journal of clinical investigation* 121, 3609–3622.

- Mandal, A., Viswanathan, C., 2015. Natural killer cells: In health and disease. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 8, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2014.11.006>
- Marcus, A., Mao, A.J., Lensink-Vasan, M., Wang, L., Vance, R.E., Raulet, D.H., 2018. Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response. *Immunity* 49, 754-763.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.016>
- Meazza, R., Azzarone, B., Orengo, A.M., Ferrini, S., 2011. Role of Common-Gamma Chain Cytokines in NK Cell Development and Function: Perspectives for Immunotherapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2011/861920>
- Millard, A.-L., Valli, P.V., Stussi, G., Mueller, N.J., Yung, G.P., Seebach, J.D., 2013. Brief Exercise Increases Peripheral Blood NK Cell Counts without Immediate Functional Changes, but Impairs their Responses to ex vivo Stimulation. *Frontiers in Immunology* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00125>
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology* 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
- Molinari, M., Anagli, J., Carafoli, E., 1994. Ca(2+)-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J. Biol. Chem.* 269, 27992–27995.
- Morera, D., MacKenzie, S.A., 2011. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response? *Vet Res* 42, 89. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-89>
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., Mingari, M.C., Moretta, A., 2005. Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol. Lett.* 100, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.07.004>

N

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

Neuman, R., Hayek, S., Rahman, A., Poole, J.C., Menon, V., Sher, S., Newman, J.L., Karatela, S., Polhemus, D., Lefer, D.J., De Staercke, C., Hooper, C., Quyyumi, A.A., Roback, J.D., 2015. Effects of storage-aged red blood cell transfusions on endothelial function in hospitalized patients. *Transfusion* 55, 782–790. <https://doi.org/10.1111/trf.12919>

O

Ogita, H., Takai, Y., 2008. Cross-Talk Among Integrin, Cadherin, and Growth Factor Receptor: Roles of Nectin and Nectin-Like Molecule, in: *International Review of Cytology*. Elsevier, pp. 1–54. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)65001-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)65001-3)

Old, L.J., Boyse, E.A., 1964. Immunology of experimental tumors. *Annual review of medicine* 15, 167–186.

O’Leary, J.G., Goodarzi, M., Drayton, D.L., von Andrian, U.H., 2006. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat. Immunol.* 7, 507–516. <https://doi.org/10.1038/ni1332>

Öztürk, L., Mansour, B., Yüksel, M., Yalçın, A.S., Çelikoğlu, F., Gökhan, N., 2003. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. *Clinica Chimica Acta* 332, 83–88. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00126-8](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00126-8)

P

Pallmer, K., Oxenius, A., 2016. Recognition and regulation of T cells by NK cells. *Frontiers in immunology* 7, 251.

Pasini, E.M., Kirkegaard, M., Mortensen, P., Lutz, H.U., Thomas, A.W., Mann, M., 2006. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* 108, 791–801. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-007799>

- Pettitt, D., Arshad, Z., Smith, J., Stanic, T., Holländer, G., Brindley, D., 2018. CAR-T Cells: A Systematic Review and Mixed Methods Analysis of the Clinical Trial Landscape. *Molecular Therapy* 26, 342–353. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.10.019>
- Pinkoski, M.J., Waterhouse, N.J., Heibein, J.A., Wolf, B.B., Kuwana, T., Goldstein, J.C., Newmeyer, D.D., Bleackley, R.C., Green, D.R., 2001. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12060–12067.
- Pretini, V., Koenen, M.H., Kaestner, L., Fens, M.H.A.M., Schiffelers, R.M., Bartels, M., Van Wijk, R., 2019. Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Front. Physiol.* 10, 945. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>
- Pross, H.F., Jondal, M., 1975. Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes. *Clinical and experimental immunology* 21, 226.
- R
- Reefman, E., Kay, J.G., Wood, S.M., Offenhäuser, C., Brown, D.L., Roy, S., Stanley, A.C., Low, P.C., Manderson, A.P., Stow, J.L., 2010. Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *The Journal of Immunology* 184, 4852–4862.
- Renoux, V.M., Zriwil, A., Peitzsch, C., Michaëlsson, J., Friberg, D., Soneji, S., Sitnicka, E., 2015. Identification of a Human Natural Killer Cell Lineage-Restricted Progenitor in Fetal and Adult Tissues. *Immunity* 43, 394–407. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.011>
- Robertson, M.J., Ritz, J., 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421–2438.
- Rosmaraki, E.E., Douagi, I., Roth, C., Colucci, F., Cumano, A., Di Santo, J.P., 2001. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur. J. Immunol.* 31, 1900–1909. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200106\)31:6<1900::aid-immu1900>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200106)31:6<1900::aid-immu1900>3.0.co;2-m)

Ruddell, J., Lippert, L., Babcock, J., Hess, J., 1998. Effect of 24-hour storage at 25 degrees C on the in vitro storage characteristics of CPDA-1 packed red cells. *Transfusion* 38, 424–428. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1998.38598297209.x>

S

Sadelain, M., Brentjens, R., Rivière, I., 2013. The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design. *Cancer Discovery* 3, 388–398. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548>

Said, A., Rogers, S., Doctor, A., 2015. Red cell physiology and signaling relevant to the critical care setting: *Current Opinion in Pediatrics* 27, 267–276. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000225>

Sánchez-Rodríguez, P., Rodríguez, M.C., Sánchez-Yagüe, J., 2015. Identification of potential erythrocyte phospholipid fatty acid biomarkers of advanced lung adenocarcinoma, squamous cell lung carcinoma, and small cell lung cancer. *Tumor Biology* 36, 5687–5698. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3243-3>

Sauri, H., Ashjian, P.H., Kim, A.T., Shau, H., 1996. Recombinant natural killer enhancing factor augments natural killer cytotoxicity. *J Leukoc Biol* 59, 925–931. <https://doi.org/10.1002/jlb.59.6.925>

Schäkel, K., von Kietzell, M., Hänsel, A., Ebling, A., Schulze, L., Haase, M., Semmler, C., Sarfati, M., Barclay, A.N., Randolph, G.J., Meurer, M., Rieber, E.P., 2006. Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity* 24, 767–777. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.03.020>

Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331, 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>

Schuster, I.S., Coudert, J.D., Andoniou, C.E., Degli-Esposti, M.A., 2016. “Natural regulators”: NK cells as modulators of T cell immunity. *Frontiers in immunology* 7, 235.

- Scoville, S.D., Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2017. Modeling human natural killer cell development in the era of innate lymphoid cells. *Frontiers in immunology* 8, 360.
- Screpanti, V., Wallin, R.P., Ljunggren, H.-G., Grandien, A., 2001. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *The Journal of Immunology* 167, 2068–2073.
- Semino, C., Rubartelli, A., 2010. NK cell-derived cytokines and delivery, in: *Natural Killer Cells*. Elsevier, pp. 177–188. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370454-2.00013-2>
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A., Old, L., Schreiber, R.D., 2001. Cancer immunoediting by IFN gamma and lymphocytes, in: *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY. FEDERATION AMER SOC EXP BIOL 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA*, pp. 96–96.
- Shankaran, Vijay, Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.
- Sharma, R., Das, A., 2018. IL-2 mediates NK cell proliferation but not hyperactivity. *Immunologic Research* 66, 151–157. <https://doi.org/10.1007/s12026-017-8982-3>
- Shau, H., Golub, S.H., 1988. Modulation of natural killer-mediated lysis by red blood cells. *Cellular Immunology* 116, 60–72. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(88\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0008-8749(88)90210-9)
- Shau, H.Y., Kim, A., 1994. Identification of Natural Killer-Enhancing Factor as a Major Antioxidant in Human Red Blood Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199, 83–88. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1197>
- Shimasaki, N., Jain, A., Campana, D., 2020. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 19, 200–218. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0052-1>
- Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., Coyle, A.J., 2009. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual review of immunology* 28, 367–388.
- Sionov, R.V., Assi, S., Gershkovitz, M., Sagiv, J.Y., Polyansky, L., Mishalian, I., Fridlender, Z.G., Granot, Z., 2015. Isolation and Characterization of Neutrophils with Anti-Tumor Properties. *J Vis Exp* e52933. <https://doi.org/10.3791/52933>

- Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E., Yagita, H., Takeda, K., Van Dommelen, S.L., Degli-Esposti, M.A., Hayakawa, Y., 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology* 42, 501–510.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P., Schreiber, R.D., 2006. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity, in: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 1–50. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)90001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90001-7)
- Spanholtz, J., Preijers, F., Tordoir, M., Trilsbeek, C., Paardekooper, J., De Witte, T., Schaap, N., Dolstra, H., 2011. Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process. *PloS one* 6.
- Stabile, H., Fionda, C., Gismondi, A., Santoni, A., 2017. Role of distinct natural killer cell subsets in anticancer response. *Frontiers in immunology* 8, 293.
- Stutman, O., 1976. Immunodepression and malignancy, in: *Advances in Cancer Research*. Elsevier, pp. 261–422.
- Stutman, O., 1974. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183, 534–536.
- Sungur, C.M., Murphy, W.J., 2014. Positive and negative regulation by NK cells in cancer. *Critical Reviews™ in Oncogenesis* 19.
- Swann, J.B., Smyth, M.J., 2007. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* 117, 1137–1146. <https://doi.org/10.1172/JCI31405>
- T
- Tam, Y.K., Martinson, J.A., Doligosa, K., Klingemann, H.G., 2003. Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy. *Cytotherapy* 5, 259–272.

- Teng, M.W.L., Galon, J., Fridman, W.-H., Smyth, M.J., 2015. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *Journal of Clinical Investigation* 125, 3338–3346. <https://doi.org/10.1172/JCI80004>
- Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2008. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 988–993. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>
- Thomas, L., Lawrence, H.S., 1959. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. New York: Hoeber-Harper 529–532.
- Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H.G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., Suttorp, M., Seifried, E., Ottmann, O.G., Bug, G., 2013. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* 15, 1563–1570. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.06.017>
- U
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., Van den Eynde, B.J., 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Nature medicine* 9, 1269–1274.
- V
- Vacca, P., Chiossone, L., Mingari, M.C., Moretta, L., 2019. Heterogeneity of NK Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Human and Murine Decidua. *Front. Immunol.* 10, 170. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00170>
- Van den Bosch, G., Preijers, F., Vreugdenhil, A., Hendriks, J., Maas, F., De Witte, T., 1995. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) counteracts the inhibiting effect of monocytes on natural killer (NK) cells. *Clinical & Experimental Immunology* 101, 515–520.
- Van Wijk, R., van Solinge, W.W., 2005. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 106, 4034–4042. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1622>

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2011. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>

Vivier, E., 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Sci.* 331, 44–49.

Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., Ugolini, S., 2011. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 331, 44–49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nature immunology* 9, 503–510.

W

Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., Vivier, E., 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* 106, 2252–2258.

Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J., Vivier, E., 2007. Natural killer cells: from CD3- NKp46+ to post-genomics meta-analyses. *Current opinion in immunology* 19, 365–372.

Wei, J., Zhao, J., Schrott, V., Zhang, Y., Gladwin, M., Bullock, G., Zhao, Y., 2015. Red Blood Cells Store and Release Interleukin-33. *J. Investig. Med.* 63, 806–810. <https://doi.org/10.1097/JIM.0000000000000213>

Wu, Y., Tian, Z., Wei, H., 2017. Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. *Frontiers in immunology* 8, 930.

X

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656–660. <https://doi.org/10.1038/nature05529>

Y

Yazdanbakhsh, K., Bao, W., Zhong, H., 2011. Immunoregulatory effects of stored red blood cells. *Hematology 2010, the American Society of Hematology Education Program Book 2011*, 466–469.

Yin, T., He, S., Liu, X., Jiang, W., Ye, T., Lin, Z., Sang, Y., Su, C., Wan, Y., Shen, G., Ma, X., Yu, M., Guo, F., Liu, Y., Li, L., Hu, Q., Wang, Y., Wei, Y., 2015. Extravascular Red Blood Cells and Hemoglobin Promote Tumor Growth and Therapeutic Resistance as Endogenous Danger Signals. *The Journal of Immunology* 194, 429–437. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400643>

Yokoyama, W.M., Kim, S., French, A.R., 2004. The dynamic life of natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 405–429.

Yu, J., Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2013. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends in immunology* 34, 573–582.

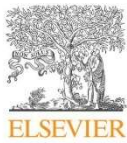
Z

Zamai, L., Ponti, C., Mirandola, P., Gobbi, G., Papa, S., Galeotti, L., Cocco, L., Vitale, M., 2007. NK Cells and Cancer. *J Immunol* 178, 4011–4016. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4011>

Zhang, Y., Huang, B., 2017. The development and diversity of ILCs, NK cells and their relevance in health and diseases, in: *Regulation of Inflammatory Signaling in Health and Disease*. Springer, pp. 225–244.

ANNEXES

Annexes : Implication dans la recherche



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.journals.elsevier.com/cytokine

High-density lipoprotein immunomodulates the functional activities of macrophage and cytokines produced during *ex vivo* macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the recent-onset human type 1 diabetes



Ibtissem Benghalem, Warda Meziane, Zeyneb Hadjidj, Lamia Ysmail-Dahlouk, Ahmed Belamri, Kheira Mouhadjer, Mourad Aribi*

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, PO Box: 262, Imama-Mansourah, 13000 Tlemcen, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2016

Received in revised form 8 February 2017

Accepted 1 March 2017

Keywords:

Autologous mixed macrophage/CD4⁺ T cells
HDL
Human type 1 diabetes
Macrophage functional activities
Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines
p-STAT4 and p-STAT6

ABSTRACT

Background: Both CD4⁺ T cells and macrophages are mainly involved in the autoimmune-mediated β -cells destruction in type 1 diabetes (T1D). The aim of this study was to examine the effect of HDL on functional activities of macrophage and its ability to regulate the production of cytokines in autologous mixed macrophage/CD4⁺ T cells at the recent-onset human type 1 diabetes.

Methods: Cell samples were isolated from volunteers with recent-onset T1D or healthy controls.

Results: The levels of the production of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , nitric oxide (NO), and hydrogen peroxide (H₂O₂) were significantly increased in the co-culture of T1D cells when compared to that of cells from healthy controls. Similarly, those of intracellular free calcium ions (μ Ca²⁺) were slightly, but not significantly increased ($p > 0.05$). Conversely, macrophage exhibited significantly decreased levels of the relative tyrosine phosphorylation of STAT6 (p-STAT6, Tyr641) in culture of T1D cells than in that of cells from healthy controls; while those of p-STAT4 (Tyr693) were significantly increased. Likewise, the levels of IL-4 and IL-10 were significantly decreased in the co-culture of T1D cells compared to co-culture of cells from healthy controls. Additionally, HDL treatment significantly down-regulated the production of IL-1 β , IL-2, IFN- γ , NO, H₂O₂, phagocytosis, bacterial killing, the relative tyrosine phosphorylation of macrophage-expressed STAT4 (p-STAT4, Tyr693), as well as the ratio of IL-1 β /IL-10, NO production/arginase activity, p-STAT4/p-STAT6, IFN- γ /IL-4, IFN- γ /IL-10, and the combined proinflammatory (PICs)/anti-inflammatory (AICs) cytokines. Moreover, HDL treatment significantly up-regulated the production of IL-4, IL-10, arginase activity, and p-STAT6 (Tyr641) (for all comparisons, $p < 0.001$).

Conclusions: We show for the first time that HDL may reverse both the functional activities of macrophages and immunoinflammatory response during reciprocal macrophage-CD4⁺ T cell crosstalk at the beginning of T1D. These findings should open the way for therapeutic trials in the short- and medium-term.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the destruction of insulin-producing β -cells thereby affecting the control of blood glucose level [1,2]. T1D is caused by a loss of self-tolerance and can be initiated by the release of autoantigens within the pancreatic islet cells [3].

Many cells are involved in the destruction of β -cells, such as macrophages, dendritic cells, B cells, and T cells [4]. During the pathogenesis of T1D, pancreatic islets are infiltrated by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Several evidences showed that both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are crucial in T1D development [4,5]. It has been reported that autoreactive T cells differentiate into effectors by engaging β -cell antigens on local antigen-presenting cells (APCs) [6]. Multiple mechanisms have been invoked to elucidate how β -cells are destroyed. T cells can directly kill the β -cells by cell-to-cell contact, through a cytotoxic process [2], but they can also influence their destruction by the release of proinflammatory cytokines [7].

T cells, in particular, CD4⁺ T cells play a central role in the development of T1D [8]. Naive CD4⁺ T cells are activated after

* Corresponding author at: Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, Imama-Mansourah, Rocade # 2, Department of Biology, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria.

E-mail addresses: m_aribi@mail.univ-tlemcen.dz, m_aribi@yahoo.fr (M. Aribi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2017.03.001>

1043-4666/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

RESEARCH ARTICLE

Rituximab Treatment Modulates the Release of Hydrogen Peroxide and the Production of Proinflammatory Cytokines by Monocyte at the Onset of Type 1 Diabetes

Linda Hamouda, Maroua Miliani, Zeyneb Hadjdidj, Rabia Messali and Mourad Aribi*

Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

Abstract: Background: Monocytes are the main blood innate mononuclear phagocyte and one of the most important effector cells expressing Fc γ receptor, which is critical for the interaction with Fc domain of antibodies.

Objective: To evaluate the effect of Rituximab (RTX, a chimeric human anti-CD20 monoclonal antibody) on the functional activities of Monocytes (MOs) at the onset of human Type 1 Diabetes (T1D).

Methods: MOs were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from volunteer patients with recent-onset T1D and healthy control donors.

Results: The levels of the production of Interleukin 1 β (IL-1 β) and IL-6 were significantly increased in MOs from patients with T1D when compared to MOs from healthy controls (respectively, $p < 0.01$ and $p < 0.05$). Similarly, Interferon γ (IFN- γ), and intracellular free Calcium Ion ($_{i}Ca^{2+}$) levels were increased in T1D MOs than in control MOs, but the difference did not reach a significant level. Conversely, the production levels of IL-4 and catalase activity, as well as of both phagocytosis and killing capacities were decreased in MOs of T1D patients compared to MOs from healthy controls, but the difference was not significant for catalase activity and killing capacity (respectively, $p < 0.01$, $p > 0.05$, $p < 0.01$, and $p > 0.05$). Additionally, treatment with RTX significantly upregulated phagocytosis ($p < 0.05$), markedly downregulated the release of IL-1 β ($p < 0.01$), $_{i}Ca^{2+}$, hydrogen peroxide (H $_2$ O $_2$), and slightly downregulated the Nitric Oxide Synthase (NOS) activity, NOS activity-to-arginase activity ratio, the levels of Lactate Dehydrogenase (LDH)-based cytotoxicity, and the production of IL-6 and IFN- γ . Moreover, RTX treatment significantly upregulated the production of IL-4 ($p < 0.05$), IL-10 ($p < 0.01$) and the catalase activity ($p < 0.05$).

Conclusion: Our study has shown for the first time that RTX can reverse the abnormal functional activities of MOs as well as their production of proinflammatory cytokines at the onset of T1D. From a therapeutic point of view, RTX may potentially be suggested at the beginning of T1D to immunomodulate innate immunity and inflammatory conditions.

Keywords: Functional activities of monocyte, phagocytosis and killing capacities, proinflammatory and anti-inflammatory/regulatory cytokines, respiratory burst, rituximab, type 1 diabetes.

1. INTRODUCTION

T1D is a chronic, slow and progressive autoimmune disease, resulting from selective destruction of insulin-producing pancreatic β -cells [1]. The immunopathogenesis of T1D is typically associated with the activation of autoreactive T cells. Other mononuclear cells are also involved in β -cells destruction, including MO and macrophage cells [2].

MOs can infiltrate pancreatic islets and participate in the disease as proinflammatory cells [3, 4]. Of note, classically

activated MOs, associated with T helper type 1 (Th1) activity, trigger an inflammatory response and induce death of β -cells using several mechanisms [4], including the increase of respiratory/oxidative burst, and the release of proinflammatory cytokines, like IL-1 β , INF- γ , and IL-6.

IL-1 β has been shown to inhibit *in vitro* insulin secretion by Langerhans islet cells, and induces their destruction [5], as well as participates in proinflammatory process at the beginning of T1D [6]. IFN- γ exerts its function mainly at the level of MOs and in the activation of autoreactive CD8 $^+$ T cells, which accelerates the destruction of β -cells by the release of perforin and cytotoxic mediators (granzymes) [7]. IL-6 is involved in the proinflammatory response and essentially produced by MOs [8].

*Address correspondence to this author at the Department of Biology, University of Tlemcen, and Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, PO Box: 262, Imama-Mansourah, Rocade # 2, 13000 Tlemcen, Algeria; E-mail: m_aribi@mail.univ-tlemcen.dz

Research Article

Increased Gustatory Response Score in Obesity and Association Levels with IL-6 and Leptin

Nesrine Remla,¹ Zeyneb Hadjidj,¹ Kamel Ghezzaz,^{1,2}
Soraya Moulessehou,³ and Mourad Aribi¹

¹Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

²Stomatology and Oral Surgery Department of Tlemcen, University Medical Centre, 13000 Tlemcen, Algeria

³Laboratory of Biototoxicology, University of Sidi Bel-Abbès, 22000 Sidi Bel-Abbès, Algeria

Correspondence should be addressed to Mourad Aribi; m.aribi@mail.univ-tlemcen.dz

Received 25 January 2016; Revised 8 May 2016; Accepted 17 May 2016

Academic Editor: Mohammed S. Razzaque

Copyright © 2016 Nesrine Remla et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. The aim of this study was to investigate the relationship between the circulating IL-6 and leptin levels with taste alteration in young obese patients. **Methods.** A retrospective case-control study was conducted in thirty obese patients and thirty age- and sex-matched healthy controls. **Results.** Circulating levels of IL-6 and leptin were significantly increased in obese patients than in controls. However, catalase and ORAC levels were significantly decreased in obese patients compared to controls. Additionally, obese participants had high scores for the detection of fats (gustatory response scores [GRS]; $p < 0.001$). Moreover, IL-6 and leptin were strongly associated with GRS alteration among patients with GRS 4 (resp., OR = 17.5 [95% CI, 1.56–193.32; $p = 0.007$]; OR = 16 [95% CI, 1.69–151.11; $p = 0.006$]). For the Mantel-Haenszel common odds ratio estimate (MH OR), IL-6 and leptin were strongly associated with obesity, in patients with either GRS 4 or GRS > 4 (resp., MH OR = 8.77 [95% CI, 2.06–37.44; $p = 0.003$]; MH OR = 5.76 [95% CI, 1.64–20.24; $p = 0.006$]). **Conclusions.** In a low grade inflammation linked to obesity, taste alteration is associated with high levels of IL-6 and leptin.

1. Introduction

The prevalence of obesity is reaching epidemic proportions and has become a global phenomenon, which is not only centred on the developed countries [1]. As per World Health Organization (WHO) estimates, the worldwide prevalence of obesity more than doubled between 1980 and 2014. In 2014, 39% of adults aged 18 years and over (38% of men and 40% of women) were overweight [2]. In the United States, more than 35.5% of men and 35.8% of women suffered from obesity in 2009–2010 [3].

North African countries and the region of Middle East just like the other developing countries are not spared from the issue of obesity. According to the Global Burden of Disease Study, these regions had the 7th highest prevalence of obesity in men (among the 21 GBD regions of the world) and the 2nd highest in women between 1980 and 2008 [1].

Algeria, Tunisia, and Morocco are part of the countries that are undergoing nutritional transitions to adapt themselves to Western lifestyles and to the demographic transitions and urbanisation. Recent data show that 14.9% of Moroccan, 29.6% of Tunisian, and 21.2% of Algerian populations suffer from obesity [4]. Another study in Algeria, conducted in 2010 by the Ministry of Health, Population and Hospital Reform, confirmed the extent of the disease in our society and stated the prevalence of obesity in both sexes at 21.24%. It is substantially higher in women than in men (30.08% versus 9.07%) [5].

Obesity is a multifactorial disease that combines both genetic and environmental factors [6], and it can be defined as an organ-associated pathology where adipose tissue plays a central role. The adipose tissue is constituted of several cell types that have the capacities of hypertrophy, hyperplasia, and differentiation [7]. It is able to secrete a number of endocrine

Clinical association of baseline levels of conjugated dienes in low-density lipoprotein and nitric oxide with aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma and their relationship with immunoglobulins and Th1-to-Th2 ratio

Mustapha Haddouche^{1,2}
Warda Meziane^{1,2}
Zeyneb Hadjidj^{1,2}
Naima Mesli³
Mourad Aribi^{1,2}

¹Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, ²Department of Biology, University of Tlemcen, ³Hematology Department, Tlemcen Medical Centre University, Tlemcen, Algeria

Correspondence: Mourad Aribi
Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Tlemcen, Imama-Mansourah, Rocade # 2, PO Box 262, Tlemcen 13000, Algeria
Tel +213 5 5628 1751
Fax +213 43 21 5534
Email m_aribi@mail.univ-tlemcen.dz

Objective: The aim of this study was to highlight the clinical association of baseline levels of conjugated dienes in low-density lipoprotein (LDL-BCD) and nitric oxide (NO) with immunoglobulins (Igs) and T helper (Th)1/Th2 ratio in patients with newly diagnosed B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL).

Patients and methods: Thirty-two newly diagnosed patients with aggressive B-cell NHL and 25 age-, sex-, and body-mass-index-matched healthy controls were randomly selected for a cross-sectional case-control study conducted at the Hematology Department of Tlemcen Medical Centre University (northwest of Algeria).

Results: Circulating levels of LDL-BCD and NO and those of IgA and IgM were significantly higher in patients than in controls. The levels of Th1/Th2 ratio and plasma total antioxidant capacity were significantly lower in patients compared with controls, while malondialdehyde and protein carbonyl levels were significantly higher in patients. B-cell NHL was significantly associated with high levels of LDL-BCD from 25th to 75th percentile (25th percentile: relative risk [RR] =2.26, 95% confidence interval [CI] 1.42–3.59, $P=0.014$; 50th percentile: RR =2.84, 95% CI 1.72–4.68, $P<0.001$; 75th percentile: RR =5.43, 95% CI 2.58–11.42, $P<0.001$). Similarly, the disease was significantly associated with high levels of NO production from 25th to 75th percentile (25th percentile: RR =2.07, 95% CI 1.25–3.44, $P=0.024$; 50th percentile: RR =2.78, 95% CI 1.63–4.72, $P<0.001$; 75th percentile: RR =4.68, 95% CI 2.21–9.91, $P<0.001$). Moreover, LDL-BCD levels were positively and significantly correlated with interferon (IFN)- γ , whereas NO levels were inversely and significantly correlated with IFN- γ and Th1/Th2 ratio.

Conclusion: LDL-BCD and NO production seem to be associated with aggressive B-cell NHL and alteration of Th1/Th2 ratio. Our results have to be examined using ex vivo mechanistic studies leading to further investigations of these parameters, with an interest in the link between Epstein-Barr virus infection and NO and immunoglobulins.

Keywords: aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma, LDL-BCD, NO production

Introduction

Non-Hodgkin lymphoma (NHL) is a nonspecific term that includes a spectrum of lymphoproliferative malignant diseases with different clinical and histological appearances.¹ Two clinical forms of NHL can be distinguished on the basis of their growth

Résumé

Introduction : Les globules rouges peuvent avoir un effet modulateur sur les cellules immunitaires, ainsi les changements dans leur dynamisme pourraient considérablement influencer leur physiologie, et par conséquent les activités immunitaires des cellules voisines, telles que les cellules NK. Ici, nous avons étudié l'effet des globules rouges et du manque de mouvement cellulaire sur la prolifération, la survie et la régulation des cellules NK périphériques issues de conditions malignes ou normales et stimulées par l'IL-2.

Matériel et méthodes : Les expériences ont été menées sur douze groupes de culture cellulaire, comprenant les cellules NK de patients atteints d'une tumeur maligne solide ou de témoins sains, cultivées seules ou avec des globules rouges autologues ou non autologues sous agitation ou sans agitation.

Résultats : les cellules NK des patients néoplasiques se sont comportées différemment selon les conditions de culture, c'est-à-dire l'agitation et / ou la présence des globules rouges. Par conséquent, la survie des cellules NK a été régulée à la baisse en absence d'agitation ; tandis que l'agitation a non seulement augmenté la survie des cellules, mais également régulé à la baisse les niveaux d'apoptose liée à p53. Aussi, les globules rouges ont augmenté la prolifération des cellules NK, tandis que cet effet a été modulé par l'agitation. De plus, les globules rouges peuvent générer des effets opposés sur la production et la modulation des cytokines protumorales ou immunosuppressives, selon l'origine des cellules NK, c'est-à-dire qu'elles proviennent de conditions néoplasiques ou saines. Enfin, les cellules NK deviennent capables d'exprimer le marqueur régulateur Foxp3 lorsqu'il y a combinaison de trois conditions principales : (i) un traitement avec une forte dose d'IL-2, (ii) la présence de globules rouges et (iii) l'absence de mouvement.

Conclusions : Nos résultats ont montré pour la première fois que la stagnation cellulaire serait fortement impliquée dans l'apoptose des cellules NK périphériques, ainsi que dans la transition vers un phénotype régulateur. De plus, en coopération avec une forte signalisation d'IL-2, les globules rouges et la stagnation peuvent induire une activité immunosuppressive chez les cellules NK. Le mouvement cellulaire et les globules rouges doivent être pris en considération dans les approches thérapeutiques stimulant les activités des cellules NK.

Mots-clés : Agitation, Cancer solide, Cellules NK du sang périphérique stimulées par l'IL-2, Cytokines, Foxp3, Globules rouges, Survie cellulaire.

Abstract

Background: Red blood cells (RBCs) can have a modulatory effect on immune cells; so changes in their dynamism could considerably influence their physiology, and consequently the immune activities of neighboring cells, like natural killer (NK) cells. Herein, we studied the effect of both RBCs and lack of cell movement on the proliferation, survival and regulation of peripheral IL-2-stimulated NK cells from normal and solid malignant conditions.

Materials and methods: Experiments were conducted on twelve cell culture groups, including NK cells from patients with solid malignant tumor or healthy controls, cultured alone or with autologous or non-autologous RBCs under shaking or no shaking conditions.

Results: NK cells from neoplastic patients behaved differently depending on the culture conditions including shaking and/or RBCs presence. Therefore, NK cells survival was downregulated in the absence of shaking; whereas, shaking have not only upregulated cell survival, but also downregulated the levels of p53-related apoptosis. Moreover, RBCs enhanced NK cells proliferation; while, this effect was modulated by shaking. Furthermore, RBCs can generate opposite effects on the production and modulation of protumoral or immunosuppressive cytokines, depending on the origin of NK cells, i.e., whether they derive from healthy or solid malignant tumor conditions. Finally, NK cells become able to express Foxp3 regulatory marker when combining three main conditions that include (i) treatment with high dose of IL-2, (ii) presence of RBCs, and (iii) absence of shaking.

Conclusions: Our outcomes showed for the first time that cell stagnation would be markedly involved in peripheral NK cell apoptosis, as well as in switching toward a regulatory phenotype-induced Foxp3. In addition, in cooperation with strong IL-2 signaling, red blood cells and stagnation can induce immunosuppressive activity in NK cells. Cell movement and red blood cells need to be considered in therapeutic approaches that stimulate NK cell activities.

Keywords: Cell survival, Cytokines, Foxp3, Peripheral blood IL-2-stimulated NK cells, Red blood cells, Shaking, Solid cancer.

ملخص

مقدمة : يمكن ان يكون للكريات الحمراء تأثير معدل على الخلايا المناعية , كما ان التغيير في ديناميكيتها قد يكون له الأثر الكبير على وظائفها الحيوية و بالتالي على الأنشطة المناعية للخلايا القاتلة الطبيعية لقد قمنا بدراسة تأثير كل من الخلايا الدم الحمراء و نقص حركة الخلايا على تكاثر بقاء و تنظيم الخلايا القاتلة الطبيعية المحيطة ذات أصل ورمي أو صحي محفزة بالانترتوكين -2.

الوسائل و الطرق : تم إجراء تجارب على 12 مجموعة زرع خلوي تحتوي على خلايا قاتلة طبيعية لمرضى يعانون من ورم خبيث صلب أو لأشخاص سالمين مزرعة في وسط زرع خلوي بمفردها او مع خلايا الدم الحمراء ذاتية أو غير ذاتية مع اهتزاز أو بدونه.

النتائج : لقد تجاوزت الخلايا القاتلة الطبيعية لمرضى الأورام بشكل مختلف وذلك حسب ظروف الزرع أي مع الاهتزاز او في وجود خلايا الدم الحمراء و نتيجة لذلك فقد لنقص بقاء الخلايا القاتلة الطبيعية مع غياب الاهتزاز في حين ان الاهتزاز في حين ان الاهتزاز يزيد فقط من بقاء الخلايا و لكن يقلل أيضا من مستويات الموت الخلوي المبرمج المرتبطة ب 53 بينما تم تعديل هذا التأثير بالاهتزاز بالإضافة إلى ذلك يمكن للخلايا الدم الحمراء ان تولد آثار معاكسة على إنتاج أو تعديل السيتوكينات الورمية المنبئة للمناعة. اعتمادا على أصل الخلايا القاتلة الطبيعية سواء كانت ذات أصل ورمي صلب او صحي. وأخيرا تصبح الخلايا القاتلة الطبيعية قادرة على نسخ ال3 عندما يكون هناك مزيج من الشروط الرئيسية الثلاثة. العلاج بجرعة عالية من الانترتوكين 2 ووجود خلايا الدم الحمراء و أخيرا غياب الحركة. **الاستنتاج :** أظهرت نتائجنا لأول مرة ان ركود الخلايا يساهم بشكل كبير في موت الخلايا المبرمج للخلايا القاتلة الطبيعية وكذلك الانتقال الى النمط ظاهري منظم بالإضافة الى ذلك و بالتعاون مع إشارات قوية للانترتوكين2 يمكن لكريات الدم الحمراء في وجود الركود ان تحت على نشاط منبسط للمناعة. قد تكون حركة الخلايا واحدة من المناهج المستعملة مخبريا المحتملة لتحفيز أنشطة وبقاء الخلايا القاتلة الطبيعية خلال السرطانات الصلبة.