



**HAL**  
open science

# Rôles des cellules Natural Killer canines et mise au point de leur identification par cytométrie de flux au BioPôle Alfort

Ruben Clodion

► **To cite this version:**

Ruben Clodion. Rôles des cellules Natural Killer canines et mise au point de leur identification par cytométrie de flux au BioPôle Alfort. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04442003

**HAL Id: dumas-04442003**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04442003v1>**

Submitted on 6 Feb 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2023

# **RÔLES DES CELLULES NATURAL KILLER CANINES ET MISE AU POINT DE LEUR IDENTIFICATION PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX AU BIOPOLE ALFORT**

## **THÈSE**

pour obtenir le diplôme d'État de

## **DOCTEUR VÉTÉRAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 20 octobre 2023

par

**Ruben, Serge, Alain CLODION**

sous la direction de

**Delphine LE ROUX**

## **JURY**

<b>Président du jury :</b>	<b>M. Grégory JOUVION</b>	Professeur à l'EnvA
<b>Directrice de thèse :</b>	<b>Mme Delphine LE ROUX</b>	Maître de Conférences à l'EnvA - HDR
<b>Examineur :</b>	<b>M. Edouard REYES-GOMEZ</b>	Maître de Conférences à l'EnvA



Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version juillet 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigé	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valérie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Aix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckekroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagré	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC



# Remerciements

**Au Président du Jury de cette thèse, M. Grégory JOUVION, Professeur à l'EnvA,** pour l'enseignement fourni tout au long du cursus et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider cette thèse. Sincères remerciements.

**À Mme Delphine Le Roux, Maître de conférences à l'EnvA,** pour m'avoir guidé tout au long de la réalisation de cette thèse, pour votre gentillesse, patience et bienveillance. Merci pour votre aide précieuse, hommages respectueux.

**À M. Edouard Reyes-Gomez, Maître de conférences à l'EnvA,** pour l'enseignement fourni tout au long du cursus et pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Sincères remerciements.

**Au personnel du Biopôle Alfort,** pour la bienveillance dont il a fait preuve et l'aide apportée tout au long des expérimentations.

**Au service des Urgences et Soins Intensifs (UrSI) du Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort pour Animaux de Compagnie (CHUVA-AC),** pour leur aide dans la réalisation de cette thèse.



# Table des matières

---

<b>Liste des figures</b> .....	<b>3</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>13</b>
<b>Première partie : bibliographie</b> .....	<b>15</b>
1. Revue des connaissances sur la cellule Natural Killer (NK).....	15
A. <i>Le système immunitaire inné</i> .....	15
a. Généralités.....	15
b. Les cellules lymphoïdes innées ou ILCs .....	16
B. <i>Ontogénie des cellules NK</i> .....	18
a. Chez l'Homme : .....	18
b. Chez le chien .....	21
C. <i>Morphologie et coloration</i> .....	22
D. <i>Marqueurs de caractérisation</i> .....	22
a. Chez l'Homme .....	22
b. Chez la souris .....	23
c. Chez le chien .....	23
E. <i>Répartition dans l'organisme et sous-populations</i> .....	26
F. <i>Les lymphocytes NKT</i> .....	27
G. <i>Mécanisme d'action général</i> .....	28
a. Production moléculaire, récepteurs et équilibres d'intégration .....	28
b. Interactions cellulaires.....	31
c. Influence externe.....	32
2. Approche fonctionnelle et dynamique des cellules NK .....	33
A. <i>Les cellules NK et les maladies infectieuses</i> .....	33
a. Les cellules NK et les maladies virales .....	33
b. Les cellules NK et les maladies bactériennes .....	34
c. Les cellules NK et les maladies fongiques .....	36
d. Les cellules NK et les maladies parasitaires .....	38
B. <i>Les cellules NK et les maladies auto-immunes</i> .....	39
a. Dermate atopique.....	40
b. Affections hépatiques :.....	42
c. Maladie d'Alzheimer/Dysfonctionnement cognitif canin .....	43
d. Myasthenia gravis .....	44
C. <i>Implications dans le processus de rejet de greffe</i> .....	45
D. <i>Les cellules NK et la gestation</i> .....	49
E. <i>Les cellules NK et le concept de mémoire</i> .....	51
a. La mémoire spécifique d'haptène .....	52
b. L'immunité spécifique de virus .....	52
c. Pseudo-mémoire induite par les cytokines.....	53
F. <i>Les cellules NK et les processus néoplasiques</i> .....	54
a. Implications anti-tumorales des cellules NK.....	54
b. Plasticité.....	56
c. Epuisement des cellules NK .....	57
d. Echappement néoplasique.....	57
e. Le modèle canin au centre de stratégies d'immunothérapie .....	59
f. Néoplasies des cellules NK.....	61
<b>Deuxième partie : étude expérimentale</b> .....	<b>71</b>
1. Introduction .....	71

2. Matériels et méthodes .....	71
A. <i>Matériel</i> .....	71
a. Cellules mononucléées du sang périphérique canin (PBMCs) .....	71
b. Anticorps .....	72
c. Cytomètre de flux.....	72
B. <i>Protocole</i> .....	72
a. Isolement des PBMCs à partir du sang total et protocole de marquage .....	72
b. Acquisition.....	74
3. Résultats .....	75
A. <i>Résultats du marquage avec le mix CD3/CD5/CD8</i> .....	75
a. Résultats du marquage du chien à l'origine de cette thèse.....	75
b. Résultats du marquage sur les PBMCs congelées.....	76
b. Comparaison des valeurs obtenues selon l'état de congélation .....	77
c. Effet du sexe sur les pourcentages des différentes populations parmi les cellules CD3-.....	80
B. <i>Résultats du marquage avec le mix CD3/CD5/CD8</i> .....	81
C. <i>Résultats du marquage avec le mix CD3/CD8/NKp46</i> .....	81
4. Discussion.....	82
<b>Conclusion.....</b>	<b>87</b>
<b>Liste des références bibliographiques .....</b>	<b>88</b>

# Liste des figures

---

Figure 1 : La famille des cellules lymphoïdes innées (d'après Artis et Spits, 2015).....	18
Figure 2 : Voies ontogéniques des cellules NK humaines (adapté d'Abel et al., 2018).....	19
Figure 3 : Contrôle transcriptionnel de la lignée ontogénique des cellules NK (d'après Geiger et Sun, 2016).....	20
Figure 4 : Schéma du développement des cellules NK humaines dans la moelle osseuse et les nœuds lymphatiques (d'après Abel et al., 2018).....	21
Figure 5 (gauche) : Cellule NK humaine (en bas) à proximité d'un granulocyte éosinophile (en haut), observés en microscopie optique (d'après Lazarchick, 2004).....	22
Figure 6 (droite) : Cellule NK humaine observée en microscopie électronique à transmission. Les flèches noires indiquent les mitochondries (d'après Paananen et al., 2000).....	22
Figure 7 : Marqueurs phénotypiques de surface des cellules NK canines sur la base des preuves en 2019 (d'après Gingrich et al., 2019).....	25
Figure 8 : Principales caractéristiques phénotypiques des grandes sous-populations de cellules NK humaines (d'après De Sanctis et al., 2022). .....	27
Figure 9 : Résumé des fonctions des cellules NK humaines (d'après Crinier et al., 2020).....	30
Figure 10 : Régulation de la réponse immune par les cellules NK (Vivier et al., 2008).....	31
Figure 11 : Fonctions et régulations des lymphocytes NK hépatiques (d'après Tian et al., 2013)..	32
Figure 12 : Résumé du transfert de granulysine aux trophoblastes infectés par <i>L. monocytogenes</i> par les cellules NK déciduales humaines (d'après Crespo et al., 2020)....	35
Figure 13 : Interactions et mécanismes d'action des cellules NK dans le cadre de l'immunité antibactérienne (d'après Schmidt et al., 2016).....	36
Figure 14 : Interactions entre les cellules NK et les pathogènes fongiques (d'après Schmidt et al., 2017)....	37
Figure 15 : Cellule NK humaine de la lignée NK92 conjuguée à des érythrocytes infectés par <i>P. falciparum</i> en microscopie confocale (d'après Baratin et al., 2007).. .....	38
Figure 16 : Résumé du rôle des cellules NK dans les maladies auto-immunes chez l'Homme (d'après M. Liu et al., 2021).....	40
Figure 17 : Schéma de l'axe inhibiteur des cellules NK humaines sur les ILC2s tel que proposé par Mack et al (d'après Kabashima et Weidinger, 2020).....	42
Figure 18 : Mécanismes d'alloréactivité des cellules NK dans la cadre de greffe d'organe solide (d'après López-Botet et al., 2017).....	46

Figure 19 : Les multiples rôles des cellules NK dans la transplantation rénale (d'après Pontrelli <i>et al.</i> , 2020).....	48
Figure 20 : Remodelage des artères spiralées par les cellules NK et les trophoblastes extra-villeux dans divers cas de figure : absence de gestation à gauche, prééclampsie au centre, gestation physiologique à droite (d'après Parham, 2004). .....	50
Figure 21 : Résumé des différents types de réponse mémoire et « memory-like » des cellules NK (d'après Gang <i>et al.</i> , 2020).....	52
Figure 22 : Schéma récapitulatif des réponses mémoires et « memory-like » des cellules NK envers différents pathogène (d'après Brillantes et Beaulieu, 2020).....	53
Figure 23 : La fonction des cellules NK est régulée par des récepteurs de surface et des cytokines (d'après Wolf <i>et al.</i> , 2023).....	55
Figure 24 : Influence des cellules NK dans la lutte anti-tumorale et exemple d'une voie de signalisation (d'après Wolf <i>et al.</i> , 2023).....	56
Figure 25 : Mécanismes impliqués dans la dysfonction des cellules NK dans le microenvironnement tumoral humain (d'après Cózar <i>et al.</i> , 2021) .....	58
Figure 26 : Projet d'immunothérapie utilisant les cellules NK chez le chien (d'après Kisseberth et Lee, 2021).....	60
Figure 27 : Lésions retrouvées lors de lymphome extranodal à cellules NK/T de type nasal (Harabuchi <i>et al.</i> , 2019).....	62
Figure 28 : Histologie d'un nœud lymphatique d'un patient atteint de lymphome nodal à cellules NK/T positif à l'EBV (d'après Kim <i>et al.</i> , 2019).....	64
Figure 29 : Images endoscopiques d'iNKLPD (Mansoor <i>et al.</i> , 2011).....	66
Figure 30 : Coloration Wright-Giemsa d'un frottis de moelle osseuse d'un patient atteint de leucémie agressive à cellule NK (×1,000) (d'après Yang <i>et al.</i> , 2022). .....	68
Figure 31 : Microphotographies de frottis de moelle osseuse chez un chien atteint de LGLL (coloration de Wright-Giemsa) (d'après Akiyoshi <i>et al.</i> , 2019).....	69
Figure 32 : Résultats typiques en cytométrie de flux de chiens avec un(e) LGLL (d'après Jaensch <i>et al.</i> , 2022).....	70
Figure 33 : Répartition des différents éléments figurés sanguins après centrifugation (d'après Ota et Tanaka, 2017). .....	73
Figure 34 : Différentes portes sélectionnées sur le logiciel (PBMCs et lymphocytes). .....	74
Figure 35 : Comparaison du marquage entre un échantillon incubé avec les marqueurs dont le CD3 (à droite) et son échantillon témoin (à gauche).....	74
Figure 36 : Exemple de vérification du marquage effectif des cellules par les deux autres marqueurs du mix 2. ....	75

Figure 37 : Exemple de vérification du marquage effectif des cellules du chien à l'origine de cette thèse par les deux autres marqueurs du mix 2. ....	76
Figure 38 : Comparaison des différents pourcentages phénotypiques selon l'état de congélation des échantillons du chien 1. ....	78
Figure 39 : Comparaison des différents pourcentages phénotypiques selon l'état de congélation des échantillons du chien 2. ....	78
Figure 40 : Comparaison des différents pourcentages phénotypiques selon l'état de congélation des échantillons du chien 3. ....	79
Figure 41 : Comparaison des différents pourcentages phénotypiques selon l'état de congélation des échantillons du chien 4. ....	79
Figure 42 : Comparaison des différents pourcentages phénotypiques selon l'état de congélation des échantillons du chien 5. ....	80
Figure 43 : Démonstration de l'absence de réactivité de l'anticorps anti-CD5 dans un des échantillons testés. ....	81
Figure 44 : Démonstration de l'absence de réactivité du marqueur NKp46+ chez le chien IZ. ....	82



# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Répartition des marqueurs phénotypiques de surface des cellules NK canines sur la base des preuves en 2019 (d'après Gingrich <i>et al.</i> , 2019).....	30
Tableau 2 : Classification des cellules NK sanguines chez les patients atteints de MA (d'après Qi <i>et al.</i> , 2022).....	44
Tableau 3 : Résumé des caractéristiques des principaux anticorps utilisés.....	72
Tableau 4 : Synthèse des différents pourcentages phénotypiques globaux des échantillons congelés.....	76
Tableau 5 : Comparaison collective des différents pourcentages phénotypiques globaux des échantillons frais et congelés.....	77
Tableau 6 : Comparaison collective des différents pourcentages phénotypiques selon le sexe.....	80



# Liste des abréviations

---

ABMR = Antibody Mediated Rejection  
ADCC = Antibody-Dependant Cell-Mediated Cytotoxicity  
AICD = Activation-Induced Cell Death  
AIH = Autoimmune Hepatitis  
AREG = Amphiréguine  
ARN = Acide Ribonucléotidique  
BEC = Biliary Epithelial Cell  
CAR = Chimeric Antigen Receptor  
CCL = Chemokine [C-C motif] Ligand  
CD = Cluster of Differentiation  
CLP = Common Lymphoid Progenitor  
CPA = Cellule Présentatrice d'Antigène  
CDV = Canine Distemper Virus  
CIVD = Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée  
CSP = Cholangite Sclérosante Primitive  
DA = Dermatite Atopique  
DAMPs = Damage-Associated Molecular Patterns / motifs moléculaires associées à l'endommagement  
DMSO = Dyméthylsulfoxyde  
dNK = decidual NK Cell  
DSA = Donor-Specific Alloantibodies  
EBER = Epstein-Barr virus-Encoded small RNAs  
EBV = Epstein-Barr Virus  
ENKTCL = Extranodal NK/T Cell Lymphoma  
EVT = Extravillous Trophoblast  
FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting  
FLT3L = FMS-like tyrosine kinase 3 ligand  
GR = Globule Rouge  
HE = Hémalun et Eosine  
HLA = Human Leukocyte Antigen  
HSC = Hematopoietic stem cell  
IFN = Interféron  
iKIR = inhibitory Killer Immunoglobulin-like Receptor  
Ig = Immunoglobuline  
IL = Interleukine  
ILCs = Innate Lymphoid Cells  
iNK = immature NK cell  
iNKLPD = Indolent NK-cell LymphoProliferative Disorder of the GI tract)  
KC = Kupffer's Cell  
KAR = Killer cell-Activating Receptor  
KIR = Killer Immunoglobulin-like Receptor  
L = Ligand  
LGL = Large Granular Lymphocyte

LGLL = Leucémies et Lymphomes à Grands Lymphocytes Granuleux  
LMPP = Lymphoid-Primed Multipotential Progenitor  
LTi = Lymphoid Tissue Inducer  
IrNK = liver resident NK  
MA = Maladie d'Alzheimer  
MAIT = Mucosa-Associated Invariant T  
miR = Micro-ARN  
mNK = mature NK cell  
mTOR = Mechanistic Target of Rapamycin  
MSC = Mesenchymal Stem Cells  
NCR = Natural Cytotoxicity Receptor  
NK = Natural Killer  
NK-LGLL = NK-Large Granular Lymphocytic Leukaemia  
NKR = NK cell's Receptor  
NKP = NK Cells Progenitor  
NKT = Natural Killer T  
PAMPs = Pathogen Associated Molecular Patterns / motifs moléculaires associés aux pathogènes  
PB = Peripheral Blood  
PBC = Primary Biliary cholangitis  
PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell  
PBS = Phosphate-Buffered Saline  
PCR = Polymerase Chain Reaction  
PD = Programmed cell Death  
PDGF = Platelet-derived growth factor  
PDL = Programmed cell Death Ligand  
PG = Prostaglandin  
PRRs = Pattern Recognition Receptors  
RBC = Red Blood Cell  
SLT = Small Lymphatic Tissue  
Tbx21 = T-box transcription factor T-bet  
TCR = T Cell Receptor  
TCMR = T Cell-Mediated Rejection  
Tfh = lymphocytes T folliculaires helper  
TGF = Transforming Growth Factor  
TIA = T-cell Intracellular Antigen  
TIGIT = T cell immunoglobulin and ITIM domain  
Th = T helper  
TNF = Tumour Necrosis Factor  
TRAIL = Tumor necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand  
TRM = T Resident Memory  
TSLP = Thymic Stromal Lymphopoietin  
XCL = Chemokine C-motif Ligand  
uNK = uterine NK cells





# Introduction

---

Les cellules Natural Killers (NK) ont été décrites pour la première fois chez l'Homme et la souris en 1975 sur la base de la découverte dans les années 60 de cellules possédant une activité cytotoxique innée et intrinsèque. Elles sont en première ligne du concept, aujourd'hui débattu, de l'immunité innée au travers de leur rôle cytotoxique. Elles sont largement décrites chez l'Homme et la souris, malgré des différences de caractérisation inter et intra-spécifiques.

Récemment, au secteur Immunologie du BioPôle Alfort, le laboratoire d'analyses biologiques vétérinaires de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, une cytométrie de flux a été prescrite dans le cadre d'une suspicion de lymphome ou de leucémie chez un chien. Cette technique permet d'immunophénotyper les cellules, sanguines dans ce cas, à l'aide d'anticorps spécifiques. De façon intéressante, il s'agissait d'un lymphome de phénotype « ni lymphocyte B ni lymphocyte T ». Utilisant d'autres anticorps disponibles au laboratoire, les cellules ont montré un phénotype particulier, faisant penser à un lymphome « de type NK ». Les cellules NK sont difficilement identifiables en cytométrie de flux chez les chiens car il n'existait pas encore, au moment du diagnostic, d'anticorps spécifiques de ces cellules commercialement disponibles. De plus, la littérature parcourue ne montre pas de données précises sur le pourcentage de cellules NK circulantes chez le chien, sûrement dû au manque d'outils spécifiques pour les identifier.

C'est donc ainsi qu'a émergé ce sujet de thèse, afin de pouvoir donner les valeurs de référence de la présence sanguine des cellules NK en utilisant ce nouvel éventail d'anticorps disponibles au BioPôle Alfort, et d'ainsi pouvoir immunophénotyper un lymphome qui s'avèrerait négatif pour les marqueurs classiques des lymphomes B et T. Toutefois, un tel marquage n'a jamais été mis au point au BioPôle Alfort dans ce but. C'est pourquoi, en partant d'une banque de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) de chiens surnuméraires et conservées congelées au BioPôle, suite à d'autres projets de recherche cliniques, des essais de marquages avec ce panel d'anticorps ont été réalisés. Ce manuscrit se compose donc de deux parties, une première partie bibliographique qui introduit les cellules NK et la deuxième qui se consacre à l'étude expérimentale de ces cellules à partir d'une banque de cellules sanguines canines.



# Première partie : bibliographie

---

## 1. Revue des connaissances sur la cellule Natural Killer (NK)

### A. Le système immunitaire inné

#### a. Généralités

Le système immunitaire englobe une variété de structures, de processus, de molécules et de cellules qui protègent l'organisme d'antigènes représentés par des micro-organismes (virus, bactéries, champignons, parasites), des toxines ou encore de cellules tumorales (Marshall *et al.*, 2018; Tizard, 2016). L'enjeu est de ce fait de reconnaître et de réagir face à des éléments étrangers sans léser l'organisme ; la discrimination d'éléments du « non soi » et du « soi » est alors cruciale (Nicholson, 2016). Une vue simpliste consiste à le représenter comme une double ligne défensive : le système inné et le système adaptatif. Il est admis que le système immunitaire inné représente la première ligne de défense contre les pathogènes. Le mécanisme de défense actif est antigène-indépendant (donc non spécifique), réagissant en un intervalle de temps restreint après rencontre de l'élément déclencheur (Marshall *et al.*, 2018). Une absence de mémoire lui est souvent attribuée bien que ce concept soit aujourd'hui débattu voire contredit (Brillantes et Beaulieu, 2020 ; Brooks *et al.*, 2022). Par opposition l'immunité adaptative est en revanche, antigène-spécifique, antigène-dépendante, et nécessite alors un délai d'exposition à l'antigène. Une des caractéristiques de cette immunité est la capacité de mémoire garantissant à l'hôte une réponse immunitaire plus rapide et efficace en cas de réexposition de l'antigène (Marshall *et al.*, 2018). Les immunités innée et adaptative ne sont pas des mécanismes mutuellement exclusifs mais bel et bien complémentaires, et leurs défaillances conduisent à une vulnérabilité accrue de l'organisme, voire à une réponse inappropriée (Bonilla et Oettgen, 2010; Marshall *et al.*, 2018; Turvey et Broide, 2010).

L'immunité innée peut être abordée comme une coalition de 4 types de défenses que sont les barrières anatomiques (par exemple la peau), les barrières physiologiques (par exemple le pH gastrique) les barrières cellulaires et enfin les barrières humorales (Marshall *et al.*, 2018; Tizard, 2016).

Différentes molécules antimicrobiennes sont produites en continu par l'organisme, parmi lesquelles il est possible de citer les peptides anti-microbiens ou encore le système du complément. Ce dernier est un composant essentiel de l'immunité, tant innée qu'adaptative. Il est composé de dizaines de protéines plasmatiques et membranaires, et par des mécanismes de cascade, il identifie et opsonise entre autres, les pathogènes reconnus. Le complément favorise alors la phagocytose de ces derniers, bien qu'il soit également en mesure dans certaines situations, de détruire des agents pathogènes ou des cellules infectées (Aristizábal et González, 2013; Marshall *et al.*, 2018; Nicholson, 2016; Tizard, 2016).

Une inflammation se développe quelques minutes après l'endommagement d'un tissu. Lors d'une intrusion, les pathogènes introduisent *de facto* des motifs moléculaires associés (PAMPs) tandis que les cellules lysées sécrètent des motifs associés à l'endommagement (DAMPs) (Tizard, 2016). Les cellules sentinelles sont activées lors de la liaison de DAMPs ou de PAMPs avec leurs récepteurs reconnaissant ces motifs (PRRs) et produisent en conséquence des cytokines, des chimiokines et des enzymes qui exacerbent l'inflammation, inhibent la croissance de certains agents pathogènes et enclenchent les premières étapes de la réponse adaptative (Marshall *et al.*, 2018; Tizard, 2016). Les principales cytokines inflammatoires sont le facteur de nécrose tumorale de type alpha (TNF $\alpha$ ), l'interleukine 1 (IL-1) et l'interleukine 6 (IL-6) (Abbas *et al.*, 2015; Turvey et Broide, 2010). Ces cytokines sont essentielles à l'initiation de l'inflammation locale, au recrutement cellulaire et à d'autres réponses systémiques telles que la fièvre (Marshall *et al.*, 2018; Tizard, 2016). Cette réponse nécessite donc la mise en place d'un équilibre entre une production cytokinique suffisante pour une réponse immunitaire efficace, et une surproduction qui pourrait causer des dommages collatéraux à l'organisme. Leur demi-vie courte permet en partie de limiter la survenue de la seconde assertion, bien que la survenue de dommages systémiques et collatéraux soit largement décrite lors de réponses inadaptées (Fajgenbaum et June, 2020). De nombreuses cellules immunitaires sont impliquées dans la réponse immunitaire innée. On peut ainsi citer les granulocytes neutrophiles, les granulocytes éosinophiliques, les granulocytes basophiles, les mastocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules lymphoïdes innées (ILCs) et enfin les cellules NK. Ces cellules détiennent des propriétés propres bien que certaines se recoupent. A titre d'exemple les macrophages partagent des propriétés de phagocytose avec les neutrophiles et sont impliqués dans la présentation antigénique aux lymphocytes T tout comme les cellules dendritiques (Aristizábal et González, 2013; Marshall *et al.*, 2018; Turvey et Broide, 2010). Les ILCs seront développées dans la partie suivante.

### ***b. Les cellules lymphoïdes innées ou ILCs***

D'après les littératures humaine et murine, les ILCs représentent les pendants innés de certains lymphocytes T, et se caractérisent par une absence de récepteurs antigéniques adaptatifs (Artis et Spits, 2015; Vivier *et al.*, 2018). Il s'agit de cellules résidentes de tissus, intégrées dans l'homéostasie tissulaire, la réponse innée à divers pathogènes et la régulation de l'inflammation tissulaire (Figure 1). Par ailleurs il a été démontré que leurs différentes sous-populations sont douées de plasticité (Vivier *et al.*, 2018). Bien que ces dernières aient d'ores et déjà été intensément étudiées chez l'Homme ou la souris, il est à noter un manque d'études à ce sujet concernant le chien, et par conséquent l'existence de nombreuses lacunes ontogéniques, phénotypiques et fonctionnelles (Gingrich *et al.*, 2019).

Il existe par ailleurs des populations de lymphocytes T aux fonctions similaires à celles des ILCs dans certains tissus, parmi lesquelles on peut citer les cellules MAIT (mucosa-associated invariant T), les cellules TRM (T Resident Memory), diverses sous-populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ , ou encore les cellules NKT (Natural Killer T (*cf infra*))(Vivier *et al.*, 2018).

#### □ Les ILC1 et les cellules NK

Les ILC1s et les cellules NK représentent respectivement les pendants innés des lymphocytes T CD4+ helper 1 et des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (Eberl *et al.*, 2015; Vivier *et al.*, 2018). Les ILC1s sont en général non ou faiblement cytotoxiques et constituent une première ligne de défense cellulaire contre des processus tumoraux, des virus et certaines bactéries et parasites intracellulaires (Artis et Spits, 2015). Les ILC1s et les cellules NK détiennent diverses caractéristiques communes. A titre d'exemple chez ces deux types cellulaires l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) représente la principale production cytokinique par le biais du facteur de transcription T-bet (dont il faut noter une dépendance concernant les ILC1s). Une production de TNF $\alpha$  est également commune aux deux entités (Abel *et al.*, 2018; Artis et Spits, 2015; Vivier *et al.*, 2018). En revanche le caractère cytotoxique des cellules NK leur attribue de fait une classification distincte (Abel *et al.*, 2018 ; Brooks *et al.*, 2022). Ainsi, si on retrouve une forte expression de perforine chez les cellules NK, c'est l'inverse qui est retrouvé chez les ILC1s. De plus leurs voies ontogéniques diffèrent (Vivier *et al.*, 2018).

La caractérisation phénotypique précise des ILC1s reste ardue en raison de la variabilité retrouvée en fonction de l'état d'activation et du tissu de résidence. De plus elles partagent selon le tissu de résidence, certains marqueurs en commun avec les ILC3s et les cellules NK (notamment NK1.1, NKp44, NKp46 et NKp44, NKp46, CD127 respectivement chez la souris et chez l'Homme) (Vivier *et al.*, 2018).

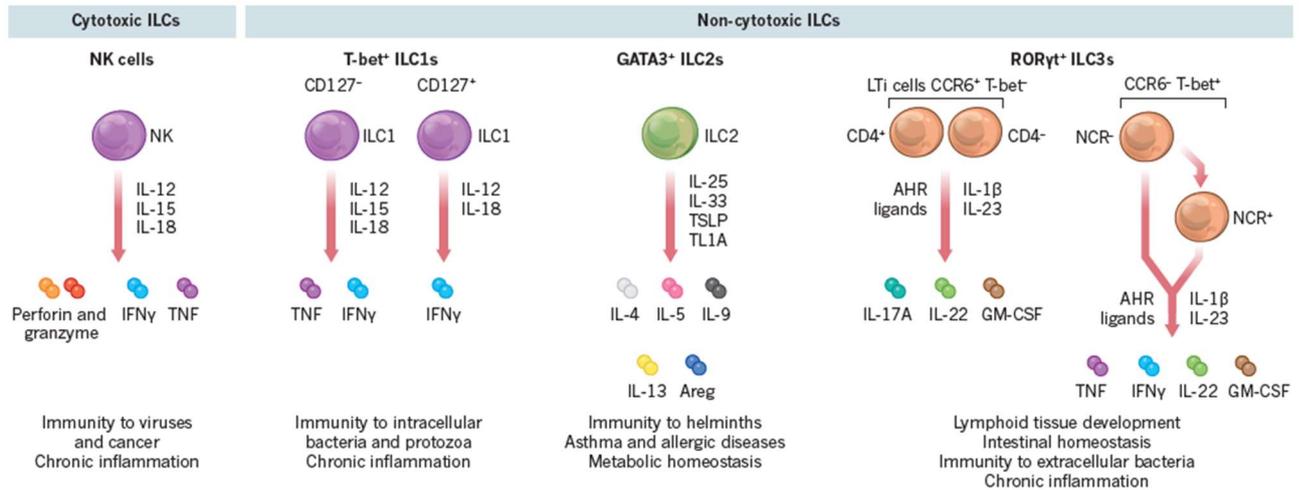
#### □ Les ILC2s

Il s'agit des pendants innés des lymphocytes Th2 (Eberl *et al.*, 2015; Vivier *et al.*, 2018). Les ILC2s sont définies par leur capacité à produire des cytokines de type 2 telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 (Artis et Spits, 2015; Vivier *et al.*, 2018). Elles sont impliquées dans la réponse innée aux parasites et dans la réparation tissulaire par le biais de la production d'AREG (une cytokine au rôle pro-mitotique chez les cellules épithéliales entre autres (Zaiss *et al.*, 2015)) (Spits *et al.*, 2013; Vivier *et al.*, 2018).

#### □ Les ILC3s

Il s'agit des pendants innés des lymphocytes Th17 (Eberl *et al.*, 2015; Vivier *et al.*, 2018). Les ILC3s sont retrouvées en grandes quantités au niveau des muqueuses, où elles se développent après la naissance à la suite d'une stimulation par le microbiote. Elles sont de fait impliquées dans la réponse immune aux bactéries extra-cellulaires, mais aussi dans l'endiguement de la flore commensale ainsi que dans la régulation de la réponse des lymphocytes Th17. Il est à noter leur production d'IL-22 qui leur permet de participer au maintien de l'homéostasie intestinale et de promouvoir la prolifération des cellules souches intestinales. Il existe deux sous-populations d'ILC3s en fonction de leur expression de NKp46 (chez la souris) ou de Nkp44 (chez l'Homme)(Spits *et al.*, 2013). Par ailleurs les ILC3s humaines et murines sont en mesure de produire du GM-CSF (une cytokine favorisant le développement et la maturation des cellules myéloïdes (Egea *et al.*, 2010)) (Artis et Spits, 2015; Vivier *et al.*, 2018).

**Figure 1 : La famille des cellules lymphoïdes innées (d'après Artis et Spits, 2015).** Les groupe 1, 2 et 3 des ILCs se définissent en fonction de l'expression de leurs marqueurs de surface, de leurs facteurs de transcription clés et des différentes cytokines sécrétées. Les ILCs sont activées par une large variété de stimuli et contribuent à l'immunité innée, au développement de l'inflammation et au maintien de l'homéostasie tissulaire. Des dérégulations des réponses des ILCs peuvent mener au développement de maladies inflammatoires chroniques, de cancers et de déséquilibres métaboliques.



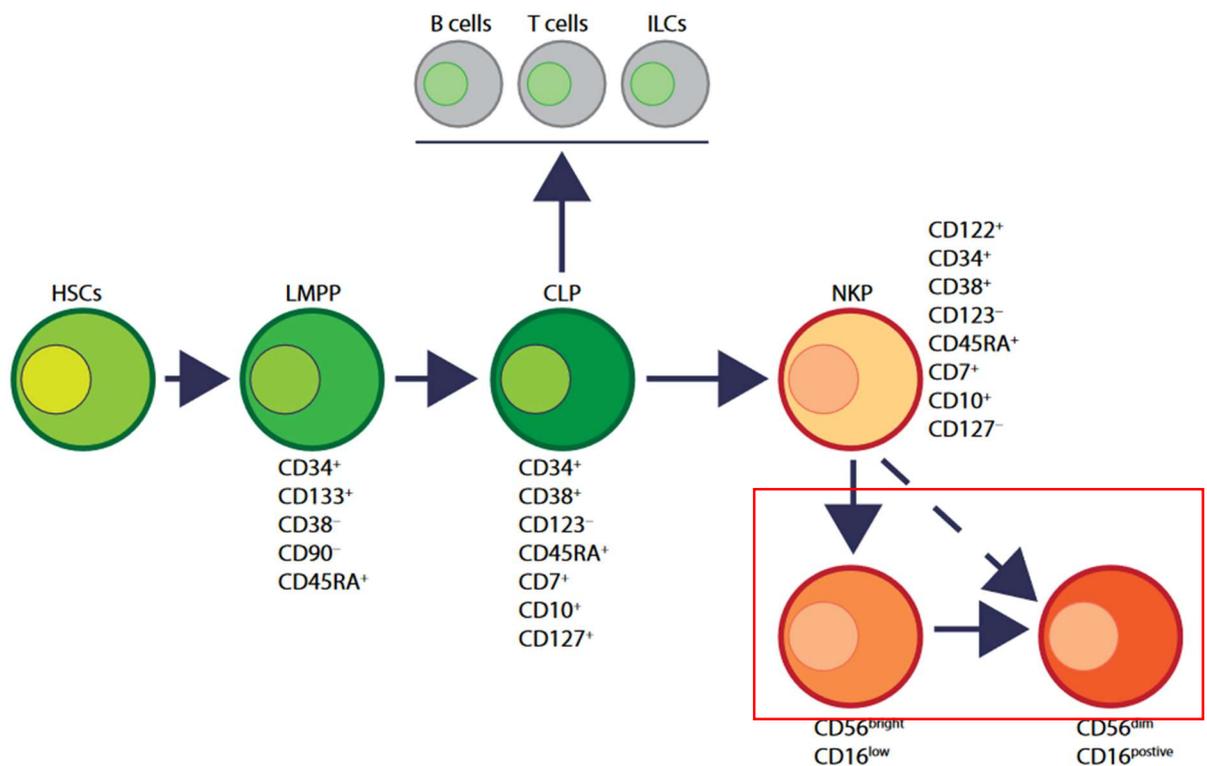
## B. Ontogénie des cellules NK

### a. Chez l'Homme :

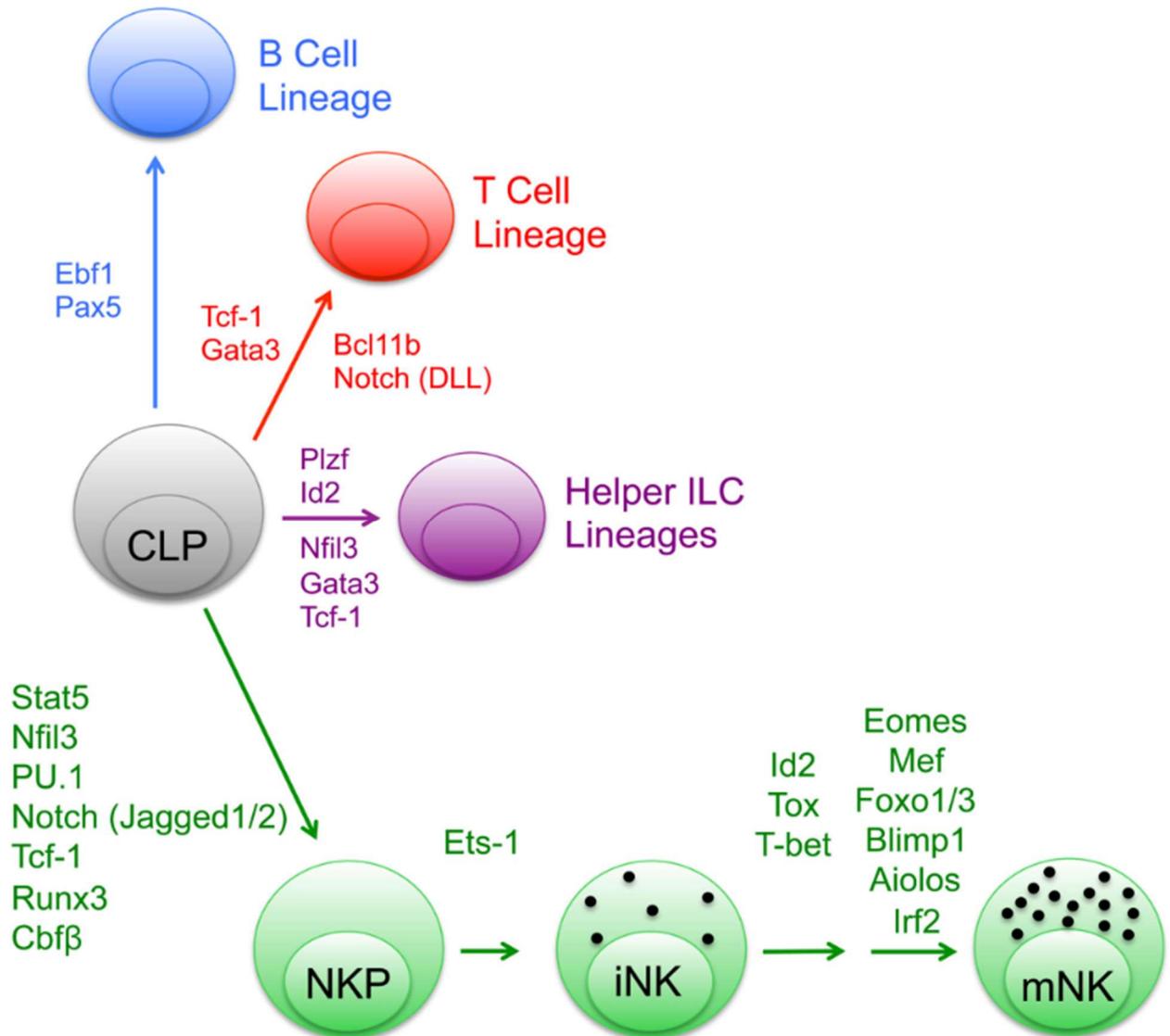
Tout comme l'ensemble des éléments figurés du sang, les cellules NK proviennent initialement de cellules souches hématopoïétiques (Figure 2) qui se définissent par deux de leurs propriétés, la première reposant sur une capacité d'auto-renouvellement à long terme, et la seconde sur la capacité à aboutir à des catégories cellulaires finales différenciées. Cet équilibre entre les deux points précédents est régulé par de nombreux facteurs impliqués dans la survie, le renouvellement et la différenciation cellulaires. Ces facteurs peuvent être catégorisés en intrinsèques (les facteurs de transcription) et extrinsèques (les cytokines) (Brooks *et al.*, 2022). En effet la différenciation du progéniteur lymphoïde commun (CLP) en cellules NK nécessite, entre autres, une guidance par l'éoméso-dérmine et le facteur de transcription Tbx21 (Figure 3). Ce dernier est également impliqué dans la différenciation des ILC1s (Del Zotto *et al.*, 2017). Il est aujourd'hui établi le rôle essentiel de cytokines telles que L'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 dans le développement et la différenciation de la cellule NK (Abel *et al.*, 2018). La mise en évidence du rôle d'autres cytokines (IL-12, IL-18, IL-27, and IL-35) dans l'amorçage transcriptionnel des cellules NK est en cours d'émergence (Abel *et al.*, 2018).

Il a longtemps été admis chez l'Homme que le développement des cellules NK était exclusif à la moelle osseuse sur la base de la possibilité *in vitro* d'aboutir à des cellules NK à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>, à qui on fournissait du stroma de moelle osseuse ou de l'IL15 (produit par le stroma). Cependant la découverte il y a une décennie de stades de développement intermédiaires au niveau d'organes lymphoïdes secondaires localisés dans les tonsilles palatines, la rate et les nœuds lymphatiques, a remis ce dogme en cause (Di Vito *et al.*, 2019).

**Figure 2 : Voies ontogéniques des cellules NK humaines (adapté d'Abel et al., 2018).** Les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) Lin-CD34+ se différencient en progéniteurs multipotentes à amorçage lymphoïde (LMPPs) CD45RA+. Au travers de l'expression du CD38, CD7, CD10, et du récepteur  $\alpha$  à l'IL-7 (CD127), les LMPPs amorcent une transition en CLPs qui détiennent un potentiel d'engagement dans les voies des lymphocytes T, des lymphocytes B, des ILCs, ou encore de se différencier en progéniteurs des cellules NK (NKPs). A ce titre, l'expression du récepteur  $\beta$  à l'IL-2 marque l'engagement irréversible des CLPs dans la lignée des cellules NK. L'apparition du CD56 (molécule d'adhésion des cellules neurales) signe la transition finale de cellules NK immatures (iNK) en cellules « matures » (encadrés en rouge sur la figure ci-dessous). La plupart des cellules iNK aboutit à une population CD56bright minoritaire (~5%) qui se convertit par la suite en population CD56dim majoritaire (> 90%). Il est également supposé que les cellules iNK peuvent directement aboutir à une population CD56dim (flèches en pointillés).

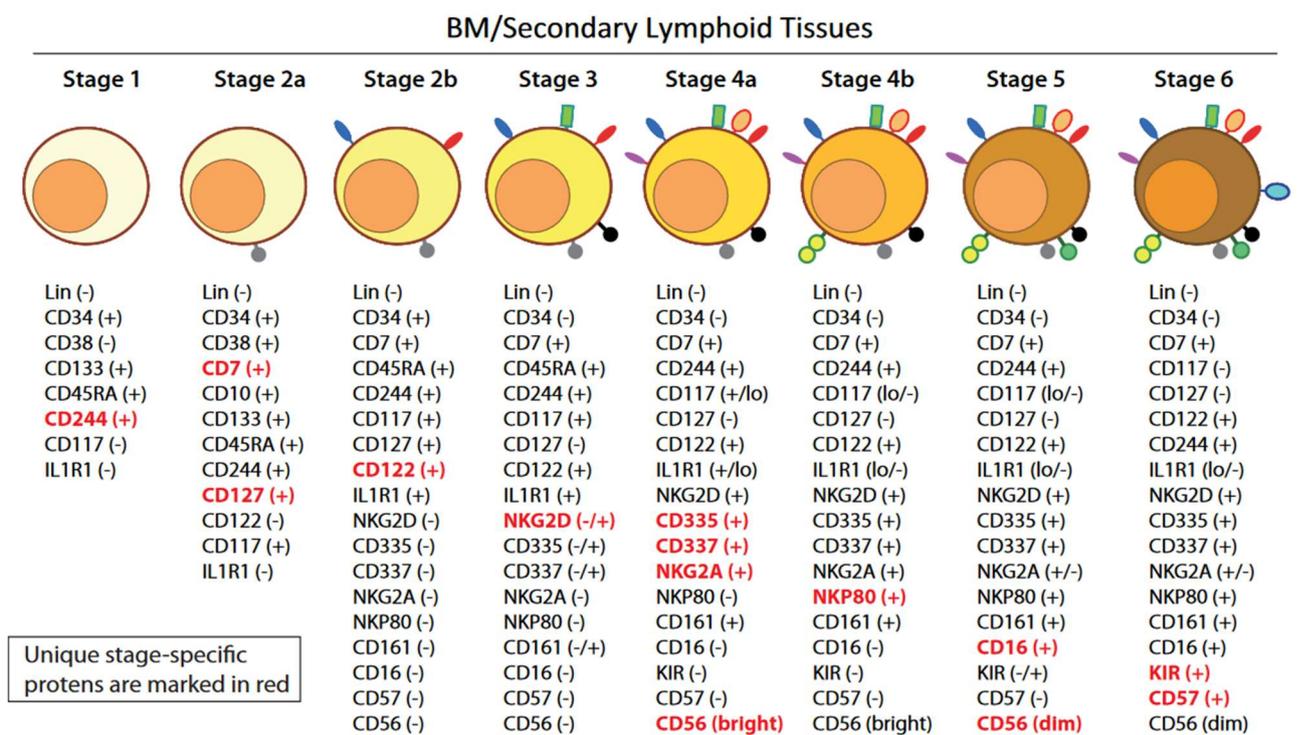


**Figure 3 : Contrôle transcriptionnel de la lignée ontogénique des cellules NK (d'après Geiger et Sun, 2016).** Un réseau complexe de facteurs de transcription régit l'aiguillage de maturation des CLPs. Une liste simplifiée des facteurs induisant les voies des ILCs et des lymphocytes T et B est présentée. À partir de la CLP, les facteurs de transcription indiqués ci-dessous promeuvent la différenciation des CLPs en NKPs, en iNKs et enfin en cellules NK matures (mNKs). Les facteurs menant la transition de l'étape iNK à l'étape mNK sont répertoriés dans deux colonnes en fonction de leur ordre chronologique supposé. Les facteurs de transcription sont placés en fonction de l'endroit où un défaut ou un arrêt du développement est observé chez la souris knockout lorsque cela est possible. L'expression des facteurs peut se produire avant l'étape indiquée.



Des travaux ont défini six stades de développement des cellules NK chez l'Homme, sur la base d'observations au sein de la moelle osseuse et des nœuds lymphatiques (Abel *et al.*, 2018 ; Scoville *et al.*, 2017) (Figure 4).

**Figure 4 : Schéma du développement des cellules NK humaines dans la moelle osseuse et les nœuds lymphatiques (d'après Abel *et al.*, 2018).** Un total de six étapes distinctes de développement a été décrit, avec les stades 2 et 4 présentant des sous-stades supplémentaires. Les cellules NK humaines expriment CD244 tout au long du processus de développement, à partir du Stade 1 (qui correspond aux précurseurs des cellules NK). CD117 (c-Kit) et les faibles niveaux d'expression de l'IL-1R1 définissent respectivement le stade 2a et le stade 2b (qui correspond aux NKP). Une expression plus élevée d'IL-1R1 définit le Stade 3 (qui correspond aux iNKs), où les expressions de NKG2D, CD335 (NKp46), CD337 (NKp30) et CD161 (NK1.1) sont initiées. Les stades 4a et 4b définissent une transition des iNKs vers des cellules NK matures, et sont différenciés par l'expression du NKp80 au stade 4b. Les expressions de NKG2D, CD335, CD337 et CD161 atteignent leur niveau maximal au Stade 4. Plus important encore, l'expression de CD56 atteint son pic (CD56bright). Des différences significatives entre le stade 4b et le stade 5 sont définies par une diminution de l'expression de CD56 (CD56dim) dans la plupart des cas, et l'initiation de l'expression de CD16 (FcγRIIIA) et du récepteur KIR (CD158) dans un sous-ensemble de cellules NK. Le stade 6 définit la génération de cellules NK "adaptatives" ou "memory-like" à la suite d'une exposition antigénique, et se caractérise par une expression élevée de NKG2C.



Le détail moléculaire de l'« éducation » des cellules NK est toujours débattu à ce jour, et les mécanismes précis la concernant restent à élucider (Abel *et al.*, 2018).

### b. Chez le chien

A notre connaissance, un manque de littérature concernant l'ontogénie des cellules NK canines est à signaler. Seules quelques données concernant la prolifération ou la survie des cellules NK sont à ce jour disponibles. Il est en revanche suggéré que le marqueur NKp46 pourrait constituer un marqueur de maturation chez le chien (Gingrich *et al.*, 2021).

De nombreuses équipes ont mentionné l'emploi de cytokines humaines recombinantes pour la prolifération des cellules NK, telles que l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-21 (Gingrich *et al.*, 2019), bien qu'il semblerait que l'IL-15 constitue davantage un facteur de survie et d'activation plutôt que de prolifération et de croissance (Gingrich *et al.*, 2021). La lignée cellulaire irradiée K562 est également

employée pour la croissance et l'activation de cellules NK en culture. L'utilisation de lignées cellulaires infectées comme cela est décrit chez l'Homme, a été tentée chez le chien sans résultats fiables et reproductibles à la clé (Gingrich *et al.*, 2019).

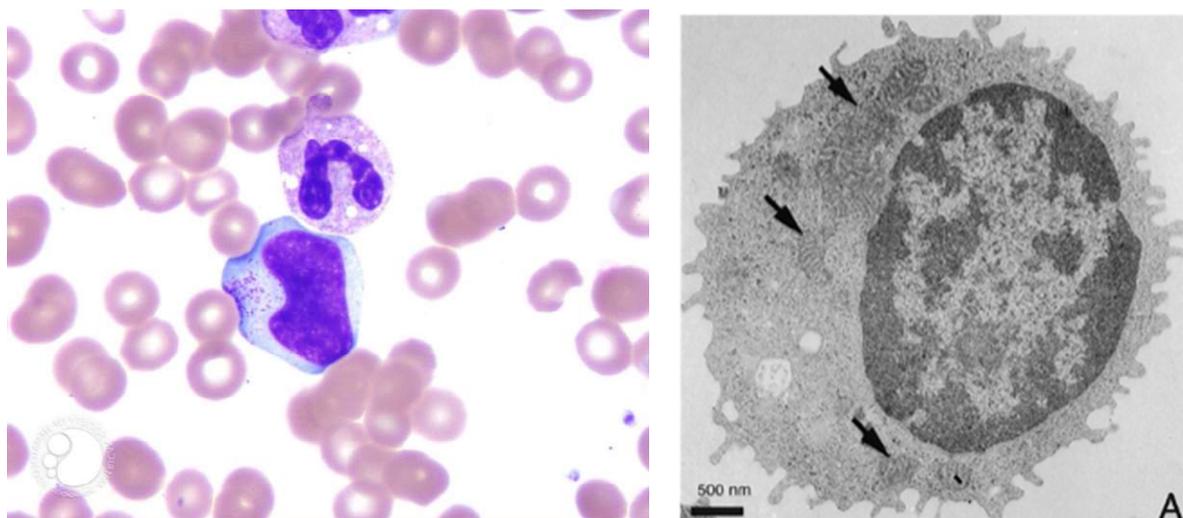
### C. Morphologie et coloration

Les cellules NK sont majoritairement caractérisées par leur grande taille parmi les lymphocytes, leur cytoplasme basophile et la présence de granules intracytoplasmiques azurophiles à la coloration de May-Grünwald-Giemsa et denses en microscopie à transmission électronique (Brooks *et al.*, 2022; Kisseberth et Lee, 2021; Tsuchiyama *et al.*, 1998) (Figure 5 & Figure 6).

Chez le chien, il est fait mention de cellules d'un diamètre entre 5,5 et 6,5 micromètres dotées d'un noyau réniforme et de granules cytoplasmiques électroniquement denses (Gingrich *et al.*, 2019; Knapp *et al.*, 1993). Par ailleurs une réactivité positive à l'acide periodique-Schiff a été observée chez les cellules NK canines (Brooks *et al.*, 2022).

**Figure 5 (gauche) : Cellule NK humaine (en bas) à proximité d'un granulocyte éosinophile (en haut), observés en microscopie optique (d'après Lazarchick, 2004).**

**Figure 6 (droite) : Cellule NK humaine observée en microscopie électronique à transmission. Les flèches noires indiquent les mitochondries (d'après Paananen *et al.*, 2000).**



### D. Marqueurs de caractérisation

#### a. Chez l'Homme

Chez l'Homme, les cellules NK périphériques sont classiquement qualifiées de CD3-/CD56+/NKp46+ (Tizard, 2016). Les cellules NK du sang périphérique ont longtemps été divisées en deux sous-populations selon l'intensité d'expression du marqueur CD56 : CD56bright et CD56dim. La première sous-catégorie est classiquement décrite comme possédant une forte capacité de synthèse de cytokines associée à une faible activité cytotoxique tandis que la seconde se démarque par une activité cytotoxique importante (Luetke-Eversloh *et al.*, 2013; Tizard, 2016). On note typiquement une moindre expression des marqueurs CD16, KIRs et CD57 chez les cellules

NK CD56bright tandis qu'elle est plus fréquente chez CD56dim (Björkström *et al.*, 2016; Gingrich *et al.*, 2019). Cependant les marqueurs CD16, KIR, CD57, mais aussi CD62L, CD94/NKG2A, CD11b, CD27 ne permettent pas d'identifier de sous-populations distinctes mais mettent plutôt en évidence un continuum d'intermédiaires complexes, et de stades de maturation parfois différents (Fu *et al.*, 2014; Luetke-Eversloh *et al.*, 2013).

### **b. Chez la souris**

Les marqueurs chez la souris varient en fonction de la souche et de la lignée en question (Gingrich *et al.*, 2019). Chez cette espèce les cellules NK sont généralement définies comme des lymphocytes CD3-NK1.1+ (un type de Ly49) ou encore CD3-NKp46+ (Walzer *et al.*, 2007). Les cellules NK murines peuvent également exprimer le CD49b, le CD27 ainsi que le CD11b, tandis qu'une absence de CD127 est observée (Fu *et al.*, 2014; « Natural Killer Cell Markers: R&D Systems », 2017). Trois sous-population sont établies en fonction de l'intensité de l'expression des marqueurs CD11b et CD27 : les cellules de phénotypes CD11dimCD27bright, CD11bbrightCD27dim et CD11bbrightCD27bright. Les cellules NK CD27dim détiennent une activité cytotoxique et une production cytokinique moindre par rapport aux cellules NK CD27bright (Fu *et al.*, 2014; Hayakawa *et al.*, 2006; « Natural Killer Cell Markers: R&D Systems », 2017).

A titre d'exemple, les souris de souche C57Bl/6 ou encore SJL (Swiss Jim Lambert) expriment les marqueurs de surface NK1.1, NKp46, et CD49b, mais pas CD3 (Goh et Huntington, 2017).

### **c. Chez le chien**

Les premiers essais de caractérisation ont mis en évidence des résultats contradictoires concernant le récepteur CD3 (marqueur traditionnel des lymphocytes T) ; avec certaines études mettant en évidence des cellules CD3+ possédant des propriétés imputables aux cellules NK, tandis que d'autres trouvaient des propriétés similaires chez des cellules CD3- (Foltz *et al.*, 2016). Il faut cependant noter une absence de marqueurs fiables lors des premières phases de recherche, d'autant que l'IL2, fréquemment utilisée pour la mise en culture des cellules NK lors des premières tentatives de caractérisation canine, stimule les cellules NK mais aussi les lymphocytes T. Ainsi il est envisageable de supposer l'existence de résultats biaisés par la présence de nombreux lymphocytes T voire NKT, lors des premières tentatives de caractérisation phénotypique des cellules NK (Michael *et al.*, 2013a). La présence du CD3 dans certaines études reste de fait énigmatique. Il est également émis l'hypothèse que les cellules NK pourraient exprimer le CD3 lors de certains stades de maturation (Lee *et al.*, 2018; Yasuda *et al.*, 2009), ou encore qu'il s'agisse d'un artefact de fixation aspécifique (notamment avec des anticorps d'autres espèces). De fait le niveau de preuve de l'expression du CD3 par les cellules NK canines n'est en l'état pas concluant ni complètement décrit (Gingrich *et al.*, 2019).

Les cellules NK canines sont CD4- et CD20- (des marqueurs phénotypiques des lymphocytes T et B, respectivement)(MCDonough et Moore, 2000). Il a cependant été observé, bien que non systématiquement, l'expression du CD8 dans certains travaux, allant jusqu'à 30% de la population sélectionnée (Lin *et al.*, 2018 ; Lin *et al.*, 2010). Une équipe (Huang *et al.*, 2008) a révélé que le marqueur CD5, et plus précisément une faible expression (CD5dim) de ce marqueur, représentait un intérêt à la caractérisation des cellules NK canines. En effet ces cellules qui

représentaient 15% des PBMCs étaient de plus grande taille que les cellules CD5<sup>bright</sup> et à la suite d'une exposition à l'IL-2, les cellules CD5<sup>dim</sup> détenaient des granules cytoplasmiques et une cytotoxicité spontanée. De plus la réalisation d'une réaction de polymérase en chaîne (PCR) sur les cellules CD5<sup>dim</sup> purifiées a mis en évidence la présence d'acide ribonucléotidique (ARN) messenger correspondant à divers récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK (Huang *et al.*, 2008).

Sur cette base, une autre étude s'est intéressée aux différences phénotypiques entre une population de grands lymphocytes granuleux (LGL) cytotoxiques (CD3+CD5<sup>dim</sup>CD21<sup>-</sup>) et celle des cellules NK sanguines (CD3<sup>-</sup>CD5<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>) (Lee *et al.*, 2018). Ainsi pendant 21 jours, les cellules CD3+CD5<sup>dim</sup>CD21<sup>-</sup> ont été mises en culture avec de l'IL-2, 15 et 21 et des cellules K562. Il a ensuite été constaté que la fréquence des cellules CD3+CD5<sup>dim</sup>CD21<sup>-</sup> avait fortement diminué tandis que celle des cellules CD3<sup>-</sup>CD5<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup> avait augmenté, et un faible nombre de cellules présentait le phénotype CD3<sup>-</sup>CD5<sup>dim</sup>CD21<sup>-</sup>. De plus, après culture ces cellules n'exprimaient pas le TCR  $\alpha\beta$  ou le TCR $\gamma\delta$ , amenant les auteurs à conclure qu'il s'agissait de cellules NK. Si les cellules CD3+CD5<sup>dim</sup>CD21<sup>-</sup> présentaient une plus forte production d'IFN $\gamma$  que les cellules CD3<sup>-</sup>CD5<sup>-</sup>CD21<sup>-</sup>, leur cytotoxicité était en revanche équivalente (Lee *et al.*, 2018). La transition phénotypique lors de la culture a été attribuée à un phénomène d'activation et il a été supposé que les phénotypes sus-cités correspondaient à différents stades de maturation des lymphocytes NK. Une étude a mis en évidence une expression variable du CD11b (42% +/- 30%) après culture chez des cellules CD3<sup>-</sup>CD5<sup>-</sup> (Michael *et al.*, 2013a).

Un autre marqueur d'intérêt chez le chien est le NKp46/NCR1, un récepteur activateur pan-mammalien des cellules NK (Gingrich *et al.*, 2019). En effet, dans une étude utilisant l'anticorps murin anti-NKp46 bovin, les phénotypes NCR1<sup>+</sup> et NCR1<sup>-</sup> ont été retrouvés parmi les cellules CD3<sup>-</sup>GranzymeB<sup>+</sup>, avec une population CD3<sup>-</sup>NCR1<sup>+</sup> qui représentait 2,5% des lymphocytes. Ces résultats sont plus faibles que la fréquence des cellules NK chez l'Homme et la souris. (Grøndahl-Rosado *et al.*, 2015 ; Huang *et al.*, 2008). Par la suite lors d'exposition des cellules triées par cytométrie de flux à de l'IL2 et de l'IL15 canines et humaines, le pourcentage de cellules CD3<sup>-</sup>NCR1<sup>+</sup> avait significativement augmenté. Après exposition à de l'IL12 humaine, l'immense majorité des cellules GranzymeB<sup>+</sup> exprimaient NCR1 (Grøndahl-Rosado *et al.*, 2016). Il a ainsi été conclu que les phénotypes CD3<sup>-</sup>GranzymeB<sup>+</sup>NCR1<sup>-</sup> et CD3<sup>-</sup>GranzymeB<sup>+</sup>NCR1<sup>+</sup> représentaient deux sous-populations de cellules NK, et que la présence de NKp46 pourrait être induite à la suite d'une exposition cytokinique (Grøndahl-Rosado *et al.*, 2016). De fait, il a été par la suite démontré que le marqueur NCR1 n'identifiait pas l'ensemble des cellules NK sanguines à l'état quiescent (Gingrich *et al.*, 2021; Grøndahl-Rosado *et al.*, 2016). Par ailleurs, bien que le marqueur CD5<sup>dim</sup> apparaisse plus sensible pour identifier de plus grands nombres de cellules NK circulantes, ce dernier inclut en réalité une population hétérogène comprenant des entités non rattachables aux cellules NK (Gingrich *et al.*, 2021, 2019). Il existait (et existe) de fait le besoin d'une caractérisation plus poussée. Sur cette base a été développé un anticorps anti-NKp46 canin par l'équipe de Foltz et al (2016), dans un contexte où un manque d'anticorps monoclonaux spécifiques des cellules NK canines était à déplorer (Foltz *et al.*, 2016).

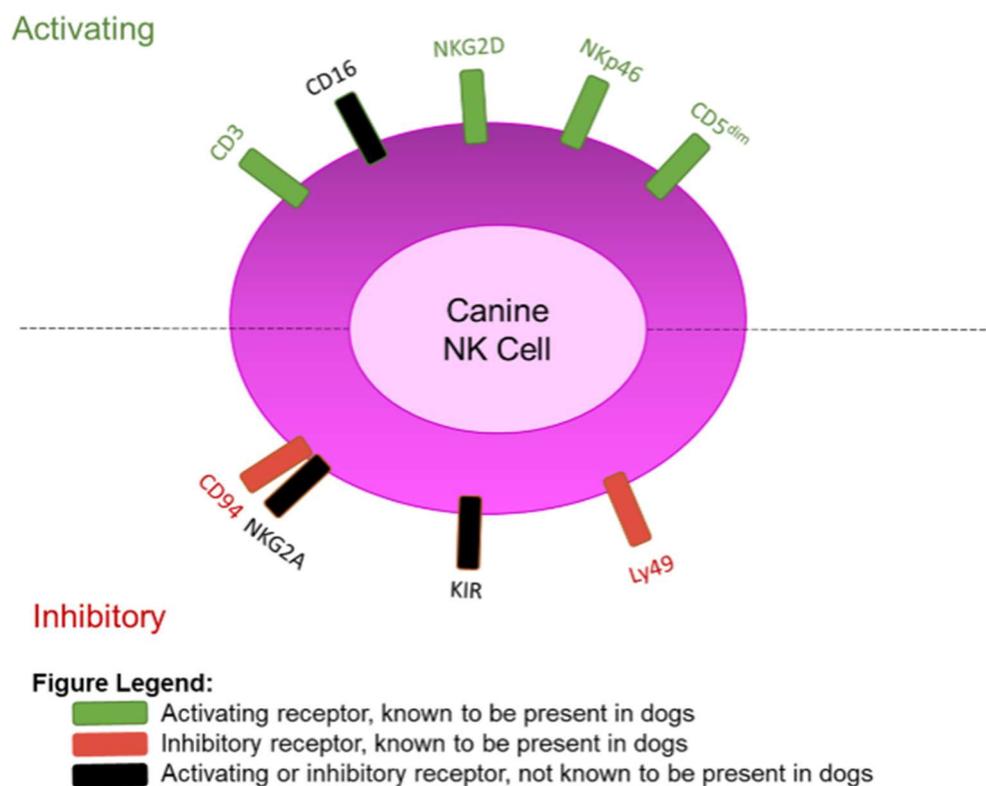
Des expériences similaires à la précédente ont été réalisées avec ce nouvel anticorps identifiant à nouveau une double population CD3<sup>-</sup>NKp46<sup>-</sup> et CD3<sup>-</sup>NKp46<sup>+</sup>, cette dernière représentant similairement à la précédente étude entre 2 et 3% des lymphocytes périphériques et possédant une importante cytotoxicité. La population CD3<sup>-</sup>NKp46<sup>-</sup> présentait une cytotoxicité

moindre en dépit d'une sécrétion cytokinique semblable, et il a aussi été démontré qu'elle pouvait exprimer le NKp46 après stimulation (Foltz *et al.*, 2016).

A notre connaissance, le dernier marqueur d'intérêt est le CD94. En effet un anticorps canin a été développé en 2019 et se liait à environ 7,7 % des PBMCs (Graves *et al.*, 2019). Cet anticorps a par la suite été testé sur une population CD5dim et deux sous-populations ont alors émergé : CD5dimCD94+NKp46+CD3- and CD5dimCD94+NKp46+CD3+ (il est à noter qu'elles étaient négatives pour les CD4 et CD21). En dépit de l'exploration d'une éventuelle présence de récepteur iTCR $\alpha$  (Gingrich *et al.*, 2019), il a été supposé que la population CD5dimCD94+NKp46+CD3+ représentait les lymphocytes NKT (Graves *et al.*, 2019).

Ainsi l'identification précise des cellules NK canines demeure un enjeu d'actualité (Figure 7).

**Figure 7 : Marqueurs phénotypiques de surface des cellules NK canines sur la base des preuves en 2019 (d'après Gingrich *et al.*, 2019).**



L'analyse du transcriptome canin a mis en évidence des gènes associés à des protéines de surface telles que KRLB1 (NK1.1), CD96, KLRF1 et KLRK1 (NKG2D). Il est à souligner par ailleurs, que le transcriptome des cellules NK canines CD3-NKp46+ démontre une plus forte similitude avec celui de l'Homme qu'avec celui de la souris (Gingrich *et al.*, 2021).

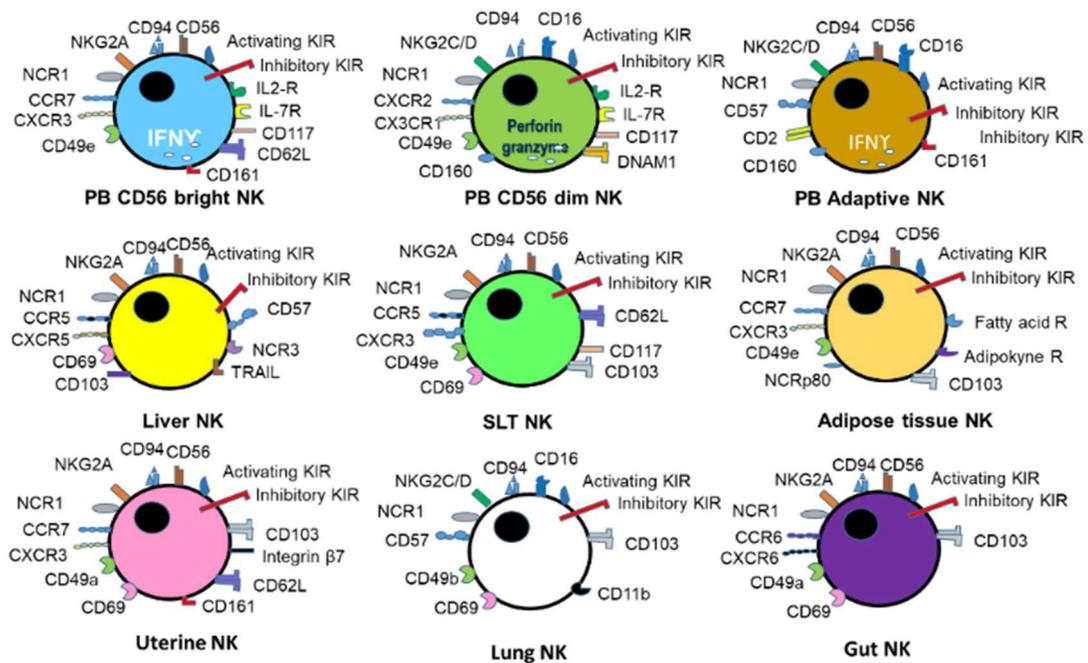
## E. Répartition dans l'organisme et sous-populations

Il est admis que les cellules NK sont largement réparties dans l'organisme (Björkström *et al.*, 2016). Chez l'Homme il est estimé que les cellules NK (tout du moins celles définies par la combinaison de marqueurs CD16+CD56+CD3-) représentent entre 5 et 20% des cellules mononuclées du sang périphérique (Langers *et al.*, 2012). D'autres travaux font état d'une grande variabilité du pourcentage de cellules NK périphériques parmi les lymphocytes tant chez l'homme (1–32.6%, avec une valeur médiane à 7.6%) que chez le chien (2.5–15%) selon les études (Gingrich *et al.*, 2019; Kisseberth et Lee, 2021). Par ailleurs le « turnover » des cellules NK humaines dans le sang humain est d'environ 2 semaines (Vivier *et al.*, 2008).

Il est estimé que les cellules NK sanguines humaines sont constituées à 90% de cellules de phénotype CD56dim et 10% de cellules CD56bright (Luetke-Eversloh *et al.*, 2013; Yamin *et al.*, 2019). Le phénotype CD56bright est en revanche majoritaire dans les organes lymphoïdes secondaires (Luetke-Eversloh *et al.*, 2013). Elles représentent entre 20 et 30% des lymphocytes hépatiques et 10% des lymphocytes pulmonaires chez l'Homme en bonne santé (Ferlazzo et Carrega, 2012).

Consécutivement à l'influence de nombreuses voies de signalisation et du micro-environnement de résidence, il est possible de résumer trois sous-populations fonctionnelles de cellules NK : les NK « tolérantes » caractérisées par une dominance des signaux inhibiteurs, les NK « cytotoxiques », caractérisées par une dominance des récepteurs activateurs, et enfin les NK « régulatrices » caractérisées par une dominance des signaux d'activation et une importante production de molécules inflammatoires. Leurs phénotypes respectifs sont principalement CD56bright et/ou CD27-/CD11b- ; CD56dim et/ou CD11b+/CD27- ; CD56bright et/ou CD7+ (Fu *et al.*, 2014). Ces différentes catégories se déclinent en prime dans une grande variété d'organes, diversifiant encore leurs spécificités (Shi *et al.*, 2011)(Figure 8). Ainsi et à titre d'exemple, les cellules NK hépatiques se retrouvent impliquées dans la tolérance du système immunitaire et dans la cinétique de diverses lésions (Tian *et al.*, 2013) tandis que les cellules NK déciduales médient la tolérance immune entre la mère et le fœtus ; et le remodelage vasculaire avec l'aide des trophoblastes villosités (Fu *et al.*, 2014; Sargent *et al.*, 2006). Ainsi une autre dichotomie peut être définie entre les cellules NK périphériques et celles résidentes de tissus, d'autant que leurs profils cytokiniques et leurs marqueurs caractéristiques diffèrent selon leur localisation (Hashemi et Malarkannan, 2020).

**Figure 8 : Principales caractéristiques phénotypiques des grandes sous-populations de cellules NK humaines (d'après De Sanctis *et al.*, 2022).**



S'il existe des particularités phénotypiques des cellules NK selon leur tissu de résidence, il reste à déterminer si cette hétérogénéité provient de signaux tissulaires périphériques ou d'une origine centrale (Luetke-Eversloh *et al.*, 2013).

Chez le chien il est supposé que le marqueur Nkp46 représente un élément discriminant entre plusieurs sous-population de cellules NK, ce dernier représentant alors un phénotype « activé » (Gingrich *et al.*, 2019).

## F. Les lymphocytes NKT

Il existe des lymphocytes exprimant simultanément des marqueurs propres respectivement aux lymphocytes T et aux cellules NK, ils sont ainsi qualifiés de « lymphocytes NKT » (Tizard, 2016). Ces caractéristiques leur permettent une activation dépendante, comme indépendante, de la signalisation par le TCR. Bien qu'issues de la lignée des lymphocytes T, leur morphologie s'apparente plus à celles des cellules NK. En effet on retrouve chez ces deux types cellulaires un faible rapport nucléo-cytoplasmique, et on note également la présence d'amas de chromatine dispersés au sein de leur noyau. Les deux entités sont qualifiées de grands lymphocytes granuleux (Krijgsman *et al.*, 2018). D'un point de vue immunophénotypique chez l'Homme, ces cellules étaient longtemps caractérisées par les marqueurs CD3+/CD56+ (Krijgsman *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2017) bien qu'il ait été mis en évidence une sous population de lymphocytes T (les lymphocytes NKT « like ») partageant la même combinaison (Krijgsman *et al.*, 2018). Chez le chien il est fait mention de cellules CD3+/CD94+ et/ou de CD5low/Nkp46+ (Graves *et al.*, 2019), voire de CD3+/iTCR $\alpha$ + (Gingrich *et al.*, 2019).

Ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  mais aussi anti-inflammatoires comme l'IL4 et l'IL10, leur permettant ainsi une activité immunomodulatrice. Elles déclenchent ainsi la libération de cytokines et de chimiokines, exacerbent la fonction des cellules NK, promeuvent la maturation des cellules dendritiques et la réponse des lymphocytes B. Leur sécrétion d'IL12 diminue notamment la production d'IL10 par les granulocytes neutrophiles. Elles inhibent également le développement des lymphocytes Th17 et régulent la production d'IL17 (Tizard, 2016; Wu et Kaer, 2011). On en distingue deux sous-catégories selon le type de TCR exprimé, qui présente par ailleurs une variabilité limitée chez ces cellules (Brooks *et al.*, 2022).

Les lymphocytes NKT1 détiennent un TCR modifié au niveau de la chaîne  $\beta$  ; et sont en mesure de reconnaître des antigènes lipidiques, lipopeptidiques et glycolipidiques à l'aide du CD1. Ils représentent environ 1% des cellules mononuclées du sang périphérique chez l'Homme et sont retrouvés préférentiellement au niveau des tissus lymphoïdes, du foie (avec un tropisme pour les sinusoides hépatiques) et du tissu adipeux (Brooks *et al.*, 2022; Tizard, 2016; Wu et Kaer, 2011). Ce type cellulaire exprime le TCR CD3, le CD28, le CD8 et le CD4 bien qu'en proportions variables selon les sous-populations (Krijgsman *et al.*, 2018).

Les lymphocytes NKT2 expriment quant à eux un TCR qualifié d'oligoclonal et sont en mesure de reconnaître des antigènes lipidiques (Brooks *et al.*, 2022; Tizard, 2016). Leur fonction est principalement anti-inflammatoire et il leur est supposément attribué un rôle immunorégulateur (Tizard, 2016). Cette catégorie contient à ce jour de nombreuses zones d'ombre quant à son phénotype précis et une partie de ses fonctions (Krijgsman *et al.*, 2018).

Bien que possédant des fonctionnalités communes les champs d'action des cellules NK et lymphocytes NKT ne se recoupent pas toujours. Il a par exemple été démontré que ces cellules exhibaient des propriétés et des profils métaboliques différents lors de l'immunité antitumorale (Liu *et al.*, 2021).

## **G. Mécanisme d'action général**

### ***a. Production moléculaire, récepteurs et équilibres d'intégration***

Les cellules NK se démarquent des autres éléments de la réponse innée par leur activité cytotoxique directe couplée à la production de cytokines (Vivier *et al.*, 2008). Les cellules NK expriment différents récepteurs de surface ayant différents rôles : activation, inhibition, adhésion, réception de cytokines ou encore chimiotactisme (Kisseberth et Lee, 2021). Lors de l'activation des cellules NK, une synapse est formée avec la cellule cible et conduit à la libération de granules cytolytiques (Thiery *et al.*, 2011). En effet la plupart des cellules NK humaines et murines sont cytotoxiques. Elles produisent des granules lytiques contenant diverses molécules (de la perforine, des granzymes chez l'Homme, le chien et la souris (Foltz *et al.*, 2016), et de la granulysine chez l'Homme) qui contribuent à la mort cellulaire chez les cellules cibles. La perforine forme des pores sur la membrane des cellules cibles, permettant alors l'entrée des autres molécules lytiques dont les granzymes qui induisent l'apoptose via l'activation de la voie des caspases (Thiery *et al.*, 2011).

Elles expriment plusieurs éléments de la famille des TNF tels que FASL et TRAIL, qui induisent l'apoptose chez les cellules cibles par le biais d'une fixation à leurs récepteurs FAS et

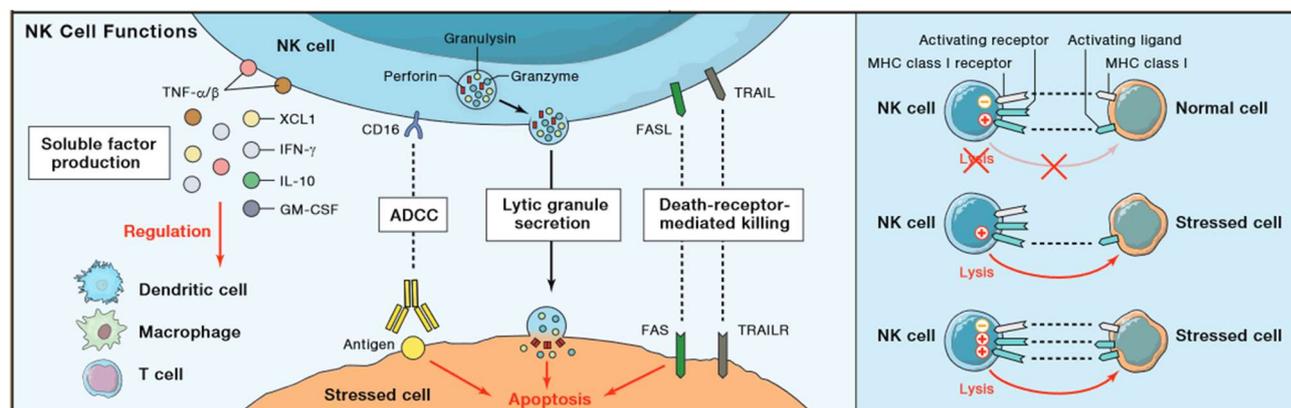
TRAILR. Il est à signaler également l'expression de TLR leur permettant de reconnaître les PAMPs qui une fois liés induisent une cascade inflammatoire aboutissant à une production cytokinique, et un recrutement des cellules présentatrices d'antigène (Noh *et al.*, 2020).

Les cellules NK produisent :

- Diverses cytokines dont les principales sont l'IFN $\gamma$  (stimulant la réponse antigène spécifique et activant les acteurs de l'immunité cellulaire innée dont les macrophages (Kang *et al.*, 2018)) ; le TNF $\alpha$  (dont les fonctions incluent une différenciation des lymphocytes Th1, une augmentation de l'activité macrophagique, une promotion de la diapédèse et une augmentation de l'expression du CMH de classe I (Mah et Cooper, 2016)), et l'IL-10 (une interleukine à rôle immunorégulateur (Saxton *et al.*, 2021)).
- Des facteurs de croissance tels que le GM-CSF.
- Des chimiokines (parmi lesquelles il est possible de citer CCL3, CCL4, CCL5, XCL (Crinier *et al.*, 2020). Les chimiokines sont une superfamille de médiateurs inflammatoires qui guident le recrutement et le positionnement des leucocytes dans les tissus sains ou malades (Gismondi *et al.*, 2010).

La modulation de la réponse des cellules NK repose sur un équilibre d'intégration de signaux en provenance de récepteurs exprimés à la surface et en réponse à diverses cytokines (telles que l'IL 15, l'IL 18 et l'IL 2). On peut globalement classer ces récepteurs dans deux catégories : les récepteurs activateurs et les récepteurs inhibiteurs. Les premiers (NKG2D, NKp30, CD16 etc.) reconnaissent des ligands spécifiques et induisent des signaux d'activation. Il est à noter la particularité du CD16 qui ne reconnaît pas directement un ligand cellulaire mais des anticorps liés à la cellule cible et qui contribue donc à la toxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC) (Lo Nigro *et al.*, 2019). Les seconds (par exemple NKG2A, KIR chez l'Homme, Ly49 chez la souris) détectent principalement des molécules du CMH de classe I et induisent des signaux inhibiteurs antagonisant les activateurs (Gingrich *et al.*, 2019; Osuna-Espinoza et Rosas-Taraco, 2023). En effet les KIRs chez l'Homme et leurs pendants murins (Ly49) correspondent à des familles liant le CMH de classe I. Lorsque ces derniers sont exprimés et liés par les cellules NK à la surface cellulaire, il n'y a classiquement pas de réponse cytotoxique initiée bien que le signal inhibiteur associé puisse être surpassé en cas d'engagement important des récepteurs activateurs (Gingrich *et al.*, 2019). De fait en cas de dérégulation du CHM de classe I lors de diverses pathologies, l'absence de signal inhibiteur abaisse le seuil d'activation et donc de cytotoxicité (Gingrich *et al.*, 2019). L'hétérodimère CD94/NKG2A est un récepteur inhibiteur reconnaissant chez l'Homme des séquences élémentaires conservées d'un point de vue évolutif contrairement aux récepteur KIRs et leur diversité de ligands, le rendant ainsi complémentaire à ces derniers (Vilches et Parham, 2002). Les KIRs font référence à des récepteurs inhibiteurs dont on note une forte diversité morphologique comparable à celle du CMH de classe I, leur permettant ainsi de reconnaître différents types de HLA (Vilches et Parham, 2002). Ainsi cette diversité présente chez les sous-populations de cellules NK permet une surveillance spécifique de chaque sous-type de HLA. De ce fait, cela inhibe la diffusion de certains pathogènes dont le mécanisme d'évasion repose sur la dérégulation de molécules du CMH I spécifiques (Vilches et Parham, 2002) (Figure 9 : Résumé des fonctions des cellules NK humaines (d'après Crinier *et al.*, 2020).

Figure 9 : Résumé des fonctions des cellules NK humaines (d'après Crinier *et al.*, 2020).



Le chien ne détient pas de KIR, et on note un unique récepteur de type Ly49 chez ce dernier (Foltz *et al.*, 2016)(Tableau 1). Bien qu'un manque de données globales et plus spécifiquement concernant les mécanismes d'activation et d'inhibition soit à noter chez le chien, il est supposé que les mécanismes sus-cités sont évolutivement conservés (Gingrich *et al.*, 2019).

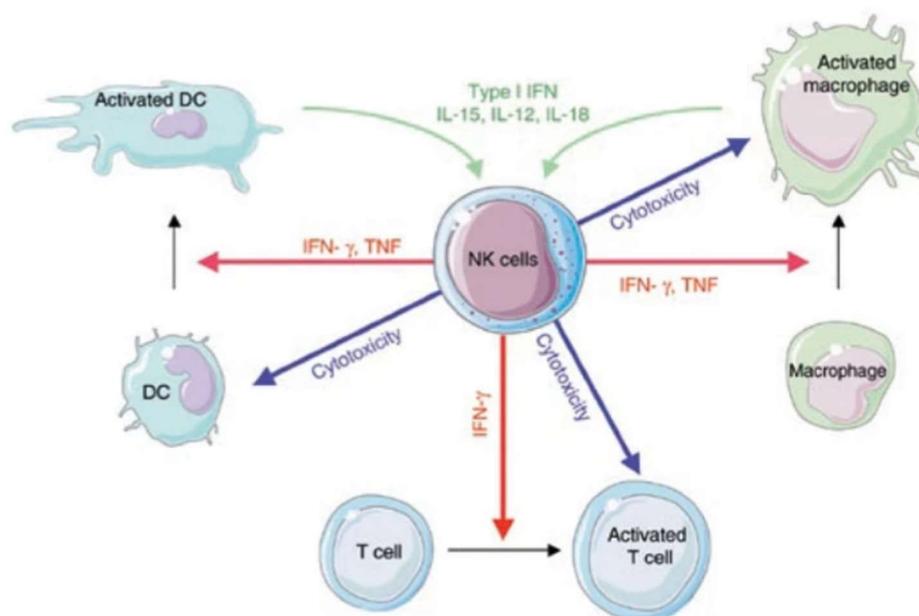
Tableau 1 : Répartition des marqueurs phénotypiques de surface des cellules NK canines sur la base des preuves en 2019 (d'après Gingrich *et al.*, 2019).

Known Canine NK Cell Activating Receptors				
Receptor	Gene	Verified by	Additional info	Homology
CD5 <sup>dim</sup>	CD5	Flow cytometry	15% of PBMCs	Human, mouse
NKp46	NCR1	Flow cytometry	2.5% of PBMCs	Human, mouse
CD16	FCGR3A	DNA Sequencing	Absent/not annotated on CanFam3.1 assembly	Human, mouse
NKG2D	KLRK1	DNA Sequencing	Annotated on CanFam3.1 assembly	Human, mouse
CD3	CD3E	Flow cytometry	Typically a T-cell marker, persists in candidate populations of canine NK cells	Human, mouse
Known Canine NK Cell MHC-I Inhibitory Receptors				
Receptor	Gene	Verified by	Additional info	Homology
Ly49	Ly49	DNA sequencing, Southern blot	Cysteine-to-tyrosine mutation present, function unknown 7% of PBMCs.	Mouse
CD94	KLRD1	Flow cytometry	Function unknown, lack of NKG2A to form heterodimer	Human, mouse
KIR	Absent	DNA sequencing	LRC appears to be truncated prior to KIR gene locations	Human

### b. Interactions cellulaires

Bien que principalement abordées sous leur angle anti-tumoral et leur capacité à lyser des cellules infectées par des virus, il est aussi à créditer aux cellules NK de multiples interactions avec des cellules de la lignée immunitaire comme non immunes (Björkström *et al.*, 2016). En effet l'intensité et la qualité de la réponse cytokinique et cytotoxique des cellules NK dépend du micro-environnement cytokinique et d'interactions avec d'autres cellules du système immunitaire telles que les cellules dendritiques, les macrophages ou encore les lymphocytes T (Long, 2007). Les interférons de type I, l'IL12, 15 et 18 sont des activateurs fonctionnels des cellules NK (Walzer *et al.*, 2005). Ces derniers voient leur activité régulée par le TGF $\beta$ , produit entre autres par les lymphocytes T régulateurs (Vivier *et al.*, 2008) (Figure 10).

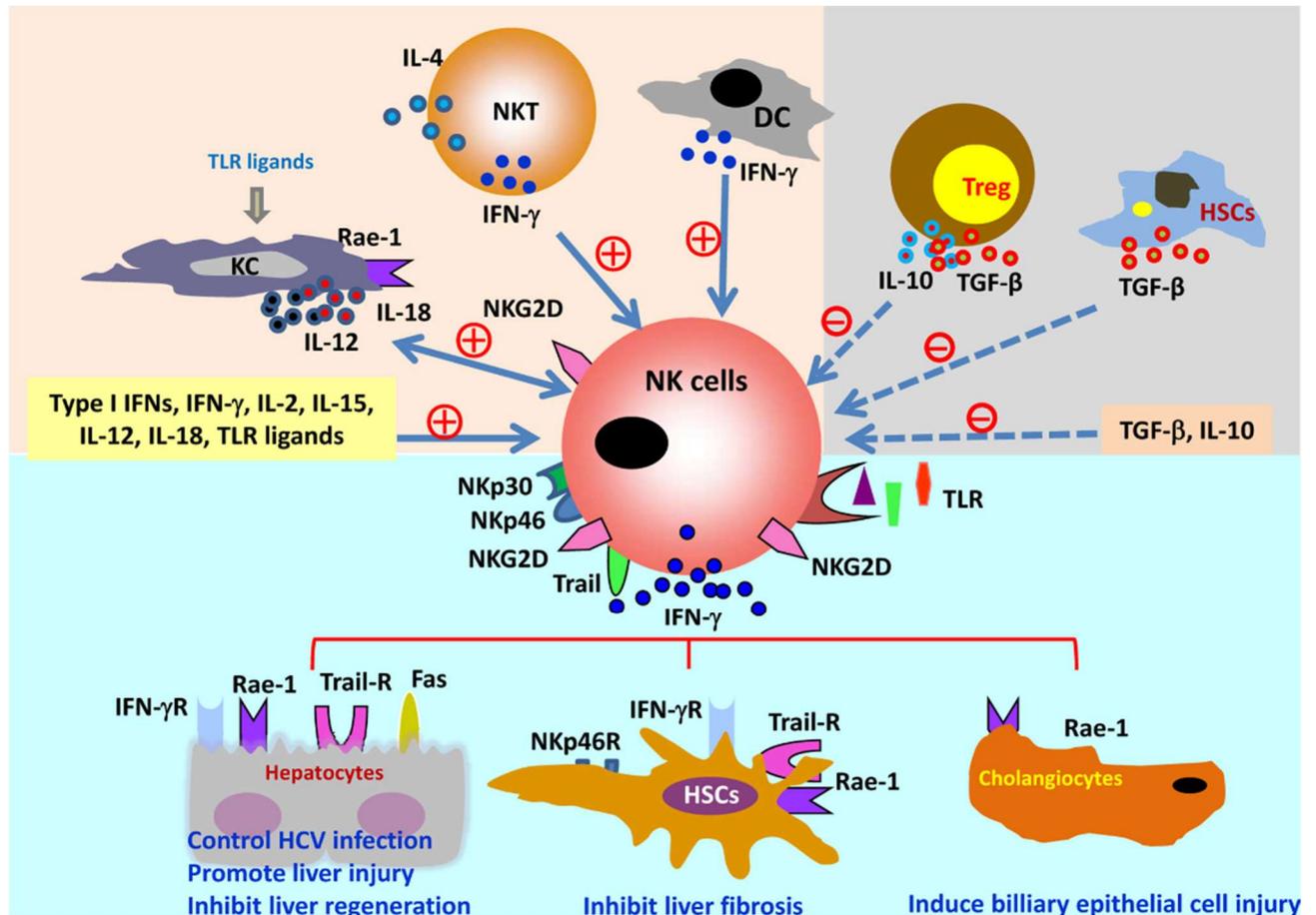
**Figure 10 : Régulation de la réponse immune par les cellules NK (Vivier *et al.*, 2008).** Les flèches rouges correspondent à une activité de promotion de la maturation et de l'activation, tandis que les flèches bleues font référence à l'action de cytotoxicité. Les flèches vertes intègrent les cytokines activatrices des cellules NK.



Les cellules NK endossent un rôle régulateur vis à vis de nombreux types cellulaires tels que les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques ou encore les cellules endothéliales. Il a en effet été démontré chez l'Homme et la souris que les cellules NK pouvaient lyser les cellules dendritiques immatures, influençant alors leur homéostasie. Indirectement les destructions cellulaires par les cellules NK favorisent la présentation antigénique croisée par ces mêmes cellules dendritiques, ce qui contribue à la réponse immune adaptative. Au travers de la production d'IFN $\gamma$  et de TNF, les cellules NK promeuvent la maturation des cellules dendritiques qui en retour activent les cellules NK par le biais de l'IL-12 (Vivier *et al.*, 2008). Toujours de par leur sécrétion d'IFN $\gamma$ , les cellules NK promeuvent la maturation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1 dans les nœuds lymphatiques (Vivier *et al.*, 2008). Elles sont également en mesure de détruire les lymphocytes T activés en fonction de leur expression du CMH de classe I (Morandi *et al.*, 2006).

Il faut de plus, attribuer aux cellules NK une capacité de communication avec des cellules non immunes telles que les cellules endothéliales, les trophoblastes ou encore les hépatocytes (Shmeleva et Colucci, 2021; Tian *et al.*, 2013; Vivier *et al.*, 2008) (Figure 11).

**Figure 11 : Fonctions et régulations des lymphocytes NK hépatiques (d'après Tian *et al.*, 2013).**



### c. Influence externe

Certains facteurs externes peuvent influencer la fonction des cellules NK. Il est par exemple admis chez l'Homme que la chimiothérapie et l'anesthésie affectent négativement le nombre et la fonction des cellules NK (Kisseberth et Lee, 2021) tandis qu'une consommation d'alcool chronique est associée à une suppression de fonction des cellules NK hépatiques (Tian *et al.*, 2013). La radiation à faible dose active les cellules NK tandis qu'elle altère la fonction de ces dernières à haute dose (Chen *et al.*, 2020). Il a aussi été démontré que diverses molécules médicamenteuses pouvaient moduler l'activité et la fonction des cellules NK chez l'Homme (Miyazato et Hayakawa, 2020).

Chez le chien une étude s'est intéressée à l'influence *in vitro* de diverses molécules anesthésiques sur la cytotoxicité des lymphocytes périphériques (sans tri des cellules NK) (Barr *et al.*, 2021). S'il n'a pas été démontré d'impact de la kétamine, de l'alfaxalone ou encore du propofol *in vitro* sur la cytotoxicité de ces lymphocytes, les émulsions lipidiques accompagnant le propofol avaient un effet réducteur sur leur cytotoxicité.

## 2. Approche fonctionnelle et dynamique des cellules NK

### A. Les cellules NK et les maladies infectieuses

#### a. Les cellules NK et les maladies virales

La lutte virale par les cellules NK requiert une activation appropriée de ces dernières mais également un recrutement efficace au(x) site(s) d'infection (Brandstadter et Yang, 2011). Les cellules NK détiennent de multiples mécanismes pour détruire les cellules infectées par des virus, incluant notamment l'implication de récepteurs de mort cellulaire, l'exocytose de granules cytolytiques ainsi que la production d'une large gamme de cytokines pro-inflammatoires détenant une activité antivirale (Lee *et al.*, 2007). L'action combinée de récepteurs activateurs permettent de prévenir l'inhibition potentiellement générée par les récepteurs inhibiteurs (De Sanctis *et al.*, 2022). Des protéines virales peuvent être reconnues par les récepteurs NCR, KIR, ou encore par le CD16 directement ou par l'intermédiaire du complément (Mancini et Vidal, 2020 ; van Erp *et al.*, 2019 ; Vivier *et al.*, 2008). Les cellules NK expriment de multiples ligands des récepteurs de mort cellulaire, incluant le Fas ligand (FasL) et le TRAIL (Colucci *et al.*, 2003), capables déclencher la voie extrinsèque de l'apoptose au travers de la voie de récepteurs de la mort exprimés sur les cellules cibles. Cependant il est attribué aux récepteurs de mort cellulaire un rôle multi-facettes et controversé dans le contrôle de l'infection et de la pathogénie associée (Cardoso Alves *et al.*, 2020). Il a été montré que, lors d'une infection virale, TRAIL module l'activité des cellules NK indépendamment de leur fonction pro-apoptotique. Chez des souris infectées par le virus de la chorioméningite lymphocytaire, la déficience en TRAIL a mené à une amélioration de la réponse spécifique des lymphocytes T CD8+, menant à une suppression plus rapide du pathogène dans l'organisme et des expériences de déplétion ont démontré que cet effet était médié par les cellules NK. Par ailleurs TRAIL exprimé par les cellules immunitaires module positivement et de façon dose-dépendante, la production de granzyme B médiée par l'IL15 des cellules NK, menant ainsi à une augmentation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T médiée par les cellules NK. Il restreint également la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK (Cardoso Alves *et al.*, 2020).

Parallèlement le relargage dans la cellule cible de granules cytolytiques contenant de la perforine et des granzymes déclenche l'apoptose cellulaire par le biais de l'activation de la voie des caspases (Brandstadter et Yang, 2011). Ainsi tandis que la perforine perméabilise la cellule cible au travers de la formation de pores membranaires, les granzymes alors insérés dérèglent le cycle cellulaire, dissolvent le noyau et lèsent la séquence d'ADN. Par ailleurs, la production de certaines cytokines (IL-12, IL-18, et TNF $\alpha$  entre autres) active les cellules cytotoxiques environnantes (De Sanctis *et al.*, 2022). La production d'IFN $\alpha$  est une fonction cruciale des cellules NK activées. En effet, en plus d'une action directe contribuant à rendre les cellules hôtes moins accessibles notamment en modulant l'expression et la distribution de récepteurs cellulaires requis pour l'entrée virale, en inhibant la synthèse, la réplication et la transcription, la stabilité du génome ou encore la transmission et la réactivation virale (Kang *et al.*, 2018) ; elle intervient également dans le recrutement d'une variété de leucocytes. Il a été démontré chez l'Homme qu'une déficience en cette cytokine augmentait significativement la survenue d'une infection virale (Novelli et Casanova, 2004).

Chez le chien il a été établi que le CDV (canine distemper virus), agent de la maladie de Carré, active les cellules NK, que ces dernières détiennent un rôle significatif dans la lutte antivirale contre cet agent et que cet effet est médié par une cytolyse directe, l'ADCC ainsi qu'une production d'IFN $\gamma$  (Park *et al.*, 2015).

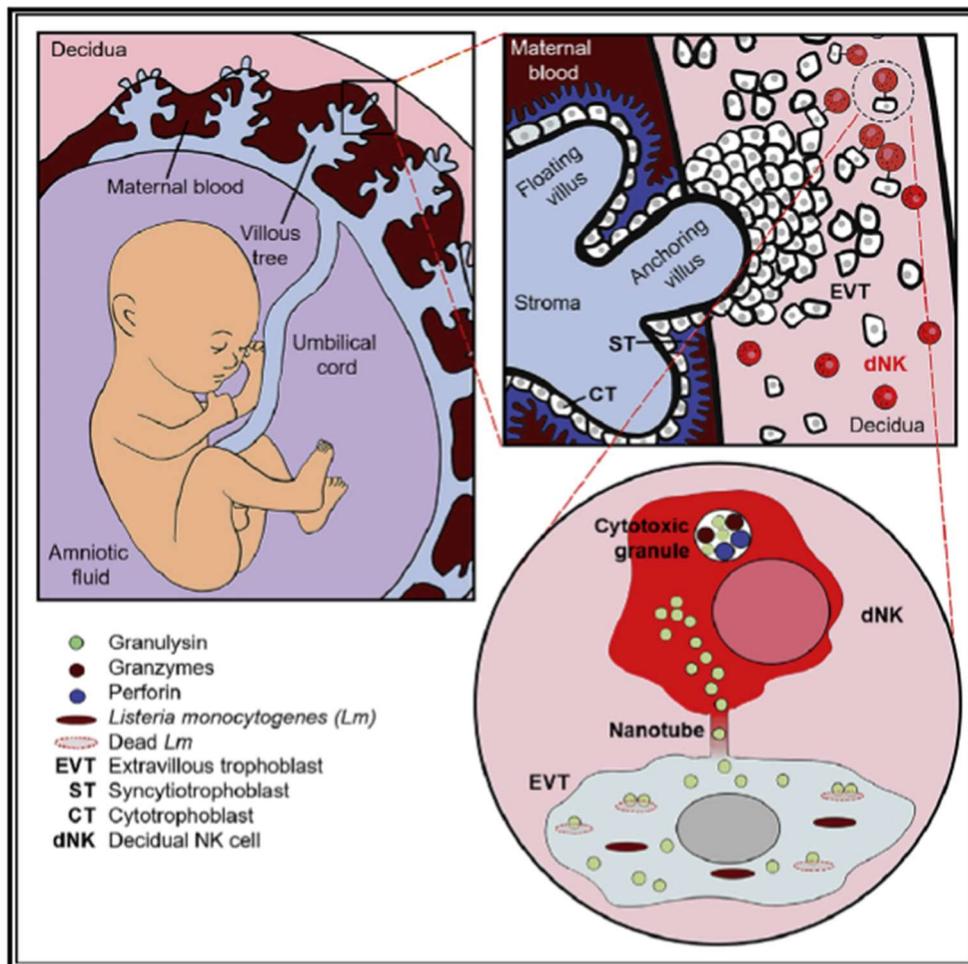
### **b. Les cellules NK et les maladies bactériennes**

Il est établi que les cellules NK détiennent un rôle dans la réponse aux infections bactériennes au travers d'une activité directe et indirecte (Schmidt *et al.*, 2016) (Figure 13). Les cellules NK expriment des PRR leur accordant la capacité de reconnaître des PAMPs (Schmidt *et al.*, 2016). A titre d'exemple les cellules NK humaines sont activées via le Toll-like receptor (TLR) 2 par une protéine de membrane de *Klebsiella Pneumoniae* (Chalifour *et al.*, 2004).

L'activité directe est médiée par l'activation des récepteurs de la mort et la sécrétion de molécules solubles (Schmidt *et al.*, 2016). Une activité de la granulysine et de la perforine a été décrite concernant une grande variété de bactéries tant gram positives que gram négatives, intracellulaires qu'extracellulaires telles que *Salmonella typhimurium*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ou encore *Mycobacterium tuberculosis* (Endsley *et al.*, 2009; Ernst *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2016). En plus de ces deux molécules, on note également la production de peptides antibactériens par les cellules NK tels que l'alpha-défensine et la cathélicidine bien que leurs rôles restent encore faiblement compris (Agerberth *et al.*, 2000). Il est également supputé une influence des récepteurs de mort cellulaire dans la lutte antibactérienne directe. En effet le LPS et *Listeria monocytogenes* sont en mesure d'activer les récepteur FasL des cellules NK (Schmidt *et al.*, 2016). Il a également été démontré que les cellules NK étaient en mesure de tuer directement la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* par le biais d'une effraction membranaire et de l'action des granzymes (Feehan *et al.*, 2022). Une équipe a démontré que le récepteur KIR2DS4 était en mesure de reconnaître un peptide bactérien présenté par l'HLA-C dont l'épitope d'intérêt est commun à de nombreuses bactéries (dont *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* et *Chlamydia trachomatis*) (Bryceson *et al.*, 2006). Ainsi il apparaît que la famille des KIRs, en plus de ses autres rôles, est impliquée dans la défense antibactérienne (Theresine *et al.*, 2020).

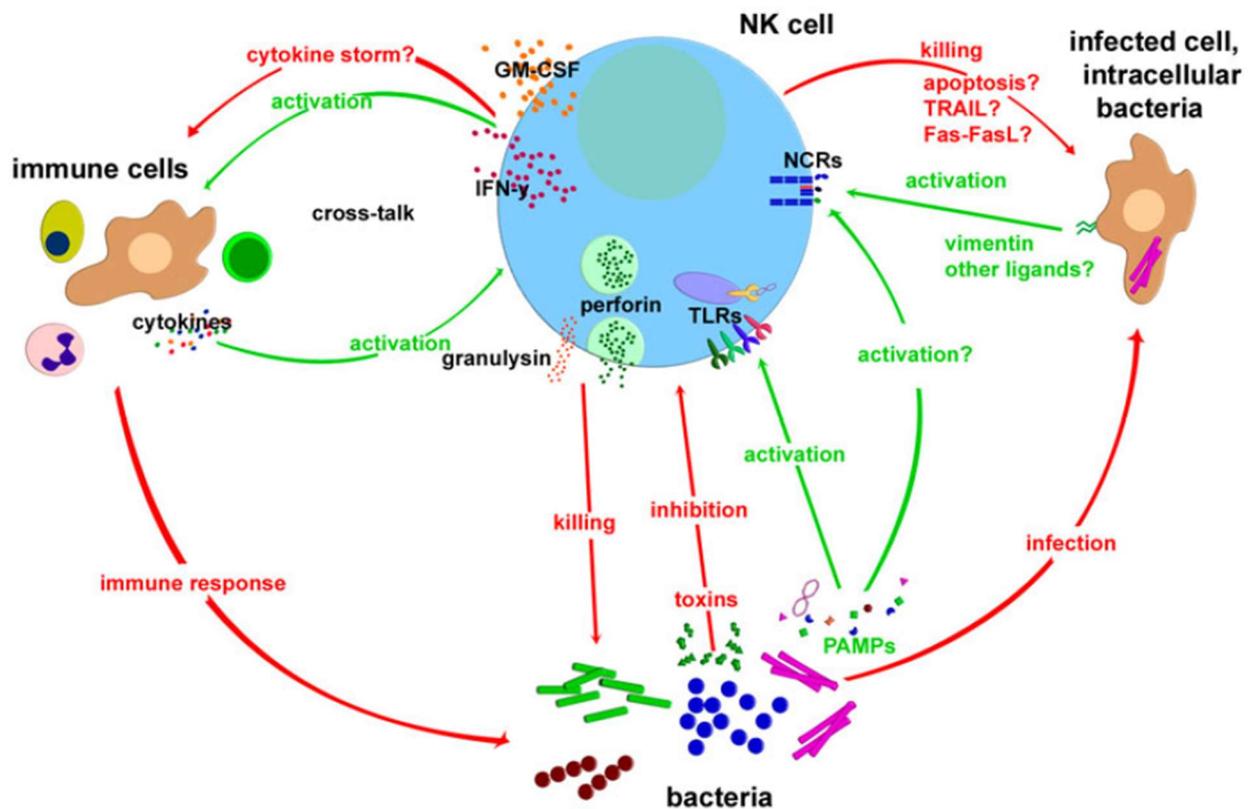
Une propriété antibactérienne notable est constatée chez les cellules NK déciduales humaines. Il a de fait été démontré que ces dernières étaient en mesure de transférer sélectivement et uniquement de la granulysine au sein des trophoblastes fœtaux infectés par *Listeria monocytogenes* par le biais de nanotubes dont le mécanisme de mise en place reste encore inconnu à ce jour, détruisant alors les bactéries sans lyser la cellule infectée (Figure 12). De plus, des souris transgéniques exprimant de la granulysine et infectées par *L. monocytogenes* détenaient une charge bactérienne plus faible et un taux d'avortement moindre par rapport au groupe témoin (Crespo *et al.*, 2020).

Figure 12 : Résumé du transfert de granulysine aux trophoblastes infectés par *L. monocytogenes* par les cellules NK déciduales humaines (d'après Crespo *et al.*, 2020).



Les cellules NK détiennent comme précisé ci-dessus une activité antibactérienne indirecte. Une fois activées les cellules NK sécrètent une large palette de cytokines et de chimiokines (Souza-Fonseca-Guimaraes *et al.*, 2012). Par exemple la production d'IFN $\gamma$  stimule la migration, l'adhérence, la phagocytose et l'activité de destruction oxydative des neutrophiles et des macrophages (Schmidt *et al.*, 2016).

Figure 13 : Interactions et mécanismes d'action des cellules NK dans le cadre de l'immunité antibactérienne (d'après Schmidt *et al.*, 2016).



Un manque de littérature sur ce sujet est à signaler chez le chien.

### c. Les cellules NK et les maladies fongiques

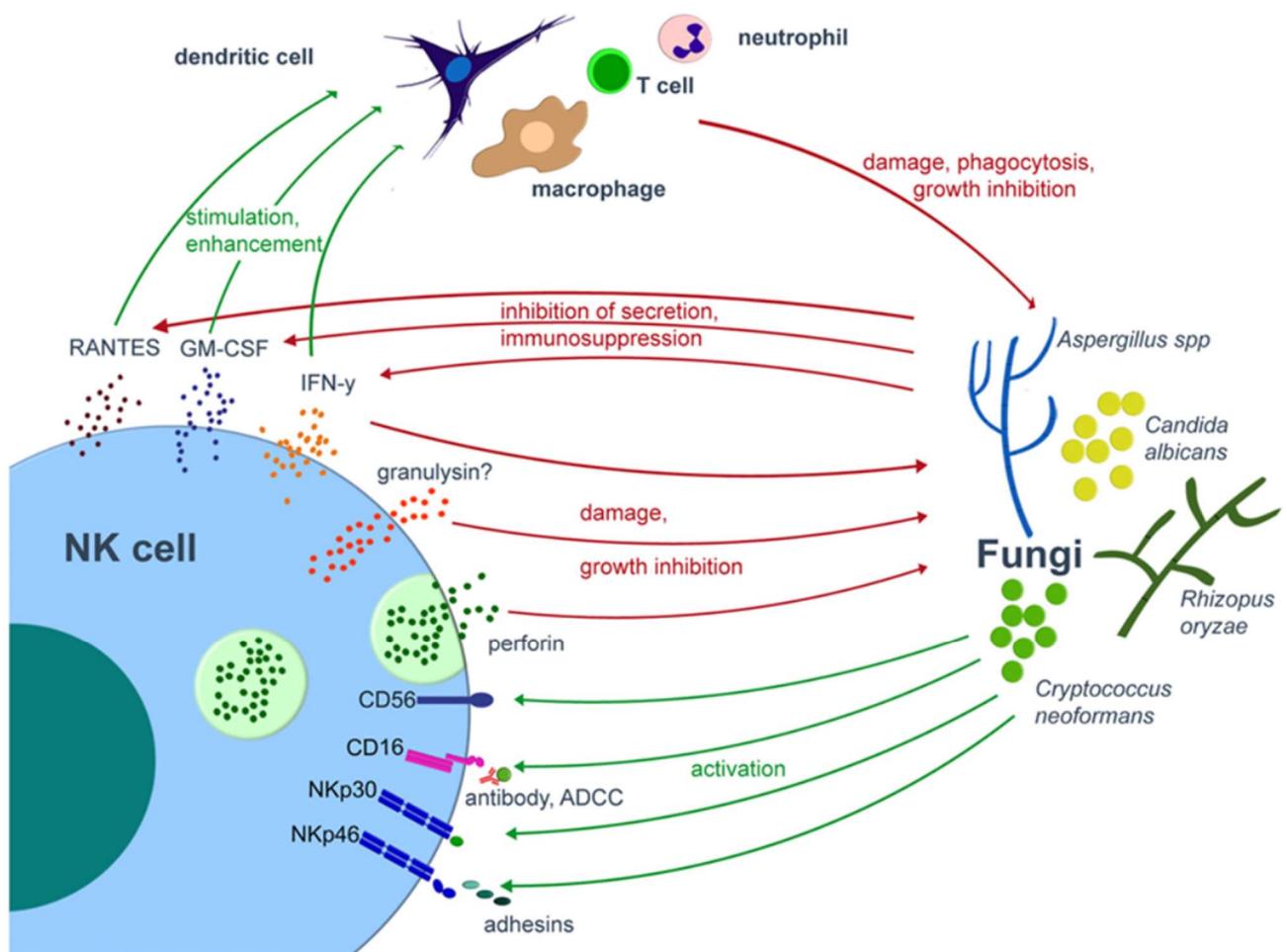
Certains champignons sont susceptibles d'être tués directement par les cellules NK (Moretta *et al.*, 2001). Diverses études ont en effet démontré que les cellules NK humaines et murines démontraient une activité anti-fongique *in vitro* contre divers pathogènes tels qu'*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Rhizopus oryzae*, *Lichthemia ramosa* ou encore *Absidia corymbifera* (Figure 14)(Schmidt *et al.*, 2017).

Il a été montré que les récepteurs et les voies de signalisation dans la destruction de champignons de la famille *Cryptococcus* différaient de ceux utilisés pour la destruction de cellules tumorales (Jones *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2016). Contrairement aux processus tumoraux où de nombreux récepteurs sont impliqués, seuls deux récepteurs activateurs, NKp30 et NKp46 sont identifiés dans la lutte anti-fongique (Ogbomo et Mody, 2017). En effet le récepteur NKp30 est en mesure de reconnaître directement et d'induire la destruction de *Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus albicans* (Li *et al.*, 2013), tandis que le NKp46 réalise les mêmes actions vis-à-vis de *Candida glabrata* (Vitenshtein *et al.*, 2016). Par ailleurs, de multiples champignons expriment de multiples PAMPs dont des adhésines, et à titre d'illustration le NKp46 reconnaît les adhésines Epa 1, 6 et 7 exprimées par *C. glabrata*. D'autres travaux sont nécessaires pour mettre en évidence d'éventuels autres récepteurs activateurs et établir si une synergie activatrice est nécessaire à la

reconnaissance et à la cytotoxicité dirigée contre les champignons (Ogbomo et Mody, 2017). Par ailleurs, dans le cadre de l'immunité anti-fongique médiée par les cellules NK, il n'est pas reporté d'utilisation du granzyme B. Les cellules NK sécrètent en revanche de la perforine pour lyser directement *C. neoformans* et *C. albicans* (Longhi *et al.*, 2012; Voigt *et al.*, 2014), de la granulysine pour tuer directement *Paracoccidioides brasiliensis* (Bouzani *et al.*, 2011), ou encore de l'IFN $\gamma$  pour endommager *Aspergillus fumigatus*. Le mécanisme précis autour des voies de signalisation de la sécrétion de granules cytotoxiques est en cours d'élucidation (Ogbomo et Mody, 2017).

Les cellules NK sont également en mesure de médier une élimination indirecte des champignons. En effet il a été montré que leur sécrétion d'IFN $\gamma$  pouvait faciliter une phagocytose de *C. albicans* par des macrophages spléniques, ou encore que leur sécrétion de GM-CSF promouvait la phagocytose neutrophilique de ce même agent pathogène (Lehrnbecher et Schmidt, 2019).

**Figure 14 : Interactions entre les cellules NK et les pathogènes fongiques (d'après Schmidt *et al.*, 2017).** Les flèches vertes indiquent une activation ou une stimulation, tandis que les flèches rouges indiquent une inhibition ou un endommagement.

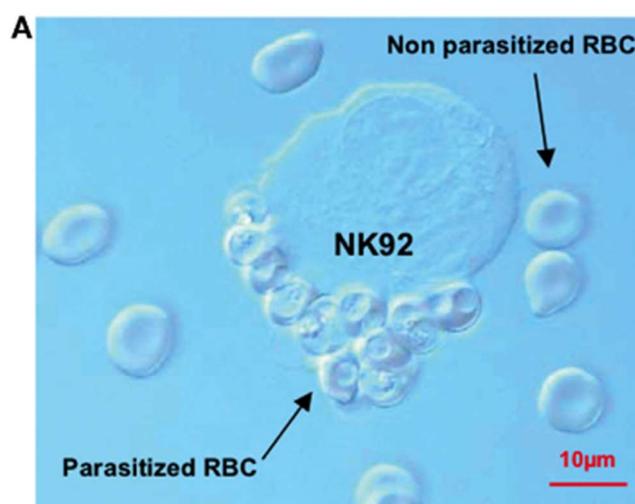


Un manque de littérature concernant l'implication des cellules NK dans la réponse anti-fongique est à souligner chez le chien.

#### d. Les cellules NK et les maladies parasitaires

Une activité anti-parasitaire est également attribuée aux cellules NK, notamment de par leur production d'IFN $\gamma$  (Lieke *et al.*, 2004) bien que moins bien étayée que pour d'autres de ses fonctions. Il a par exemple été démontré chez la souris que les cellules NK participaient directement à la phase précoce de la réponse contre *Trypanosoma cruzi* en tuant directement les parasites libres au travers d'un exocytose de granules lytiques après contact avec la pathogène dans un mécanisme dépendant de l'IL-12 produit entre autres par les macrophages infectés, bien que la lutte contre ce parasite soit principalement dépendante des lymphocytes T (Lieke *et al.*, 2004). Ainsi la déplétion en cellules NK dans un modèle murin lors d'infection par *T. cruzi* aboutit à une parasitémie élevée en phase aigüe (Cardillo *et al.*, 1996, p. 10), bien que cette déplétion n'empêche pas la mise en place par la suite d'une forte et efficace réponse Th1 (Lieke *et al.*, 2004). Il a également été établi chez l'Homme, que les IgG isolées d'adultes vivant en région endémique de malaria (*P. Falciparum*) étaient en mesure d'activer les cellules NK d'individus naïfs par le biais de l'ADCC, permettant alors une lyse sélective des globules rouges (GR) infectés *in vitro* (Arora *et al.*, 2018). D'autres travaux concernant ce pathogène ont mis en évidence une contribution directe des cellules NK contre la parasitémie via leur sécrétion d'IFN $\gamma$  et leur action cytotoxique (« naturelle » et médiée par l'ADCC) contre les hépatocytes et les GR infectés (Burrack *et al.*, 2019)(Figure 15). Il est cependant nécessaire de confirmer voire reproduire ces études pour aboutir à un niveau de preuves convaincant (Wolf *et al.*, 2017).

**Figure 15 : Cellule NK humaine de la lignée NK92 conjuguée à des érythrocytes infectés par *P. falciparum* en microscopie confocale (d'après Baratin *et al.*, 2007). La conjugaison a lieu spécifiquement avec les érythrocytes infectés.**



Des travaux chez la souris suggèrent un rôle protecteur tissulaire inattendu dans la cadre d'infection par des parasites helminthiques (*Heligmosomoides polygyrus bakeri*). La phase précoce de l'infection se traduisait par une accumulation dans l'intestin de cellules NK en provenance de la circulation sanguine par le biais des récepteurs à l'IFN $\gamma$  où elles encerclaient les larves. Une telle augmentation n'a pas été retrouvée chez les autres ILCs dans ce cadre. Des expériences de déplétion n'ont pas mis en évidence de différences majeures du point de vue parasitaire quantitatif mais ont abouti à de plus importantes lésions vasculaires. Ces résultats suggèrent que les cellules

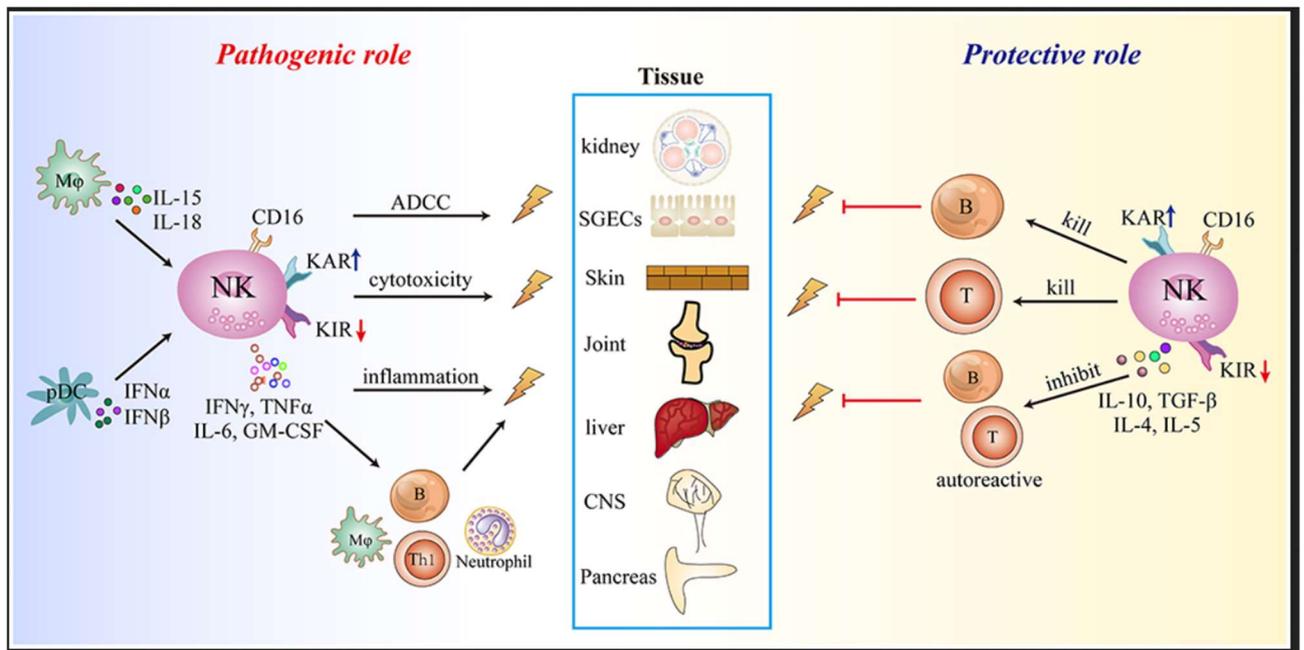
NK médient une protection tissulaire lors de certaines infections parasitaires par le biais d'un mécanisme encore inconnu (Gentile *et al.*, 2020).

Un manque de données concernant l'implication des cellules NK dans la réponse anti-parasitaire est par ailleurs à souligner chez le chien.

## **B. Les cellules NK et les maladies auto-immunes**

Les maladies auto-immunes sont causées par une réponse inappropriée envers des auto-antigènes entraînant une grande variété de lésions et de symptômes. Ces affections peuvent être spécifiques d'organes ou au contraire systémiques, et résultent souvent d'une intrication complexe avec des facteurs génétiques et environnementaux. Si les lymphocytes T auto-réactifs et les lymphocytes B producteurs d'auto-anticorps sont des acteurs majeurs des maladies auto-immunes, les ILCs, dont les cellules NK, sont retrouvées dans les tissus inflammés et prennent part à l'initiation et/ou à l'évolution de ces pathologies (Yang *et al.*, 2021). La contribution de ces dernières dans les troubles auto-immuns questionne depuis des décennies et des travaux ont mis en évidence des rôles dans l'initiation, la progression voire la résolution de ces troubles de par leur cytotoxicité et leur production cytokinique (Kucuksezer *et al.*, 2021; M. Liu *et al.*, 2021). Il est aussi fait état dans certaines affections de la présence de spécificités génétiques aboutissant à la formation de molécules pouvant jouer un rôle de ligands pour les récepteurs des cellules NK et ainsi affecter leur fonction (Harvey *et al.*, 2009). Des dysfonctions des propriétés régulatrices des cellules NK pourraient également aboutir à une réponse T non contrôlée et ainsi participer à la pathogénèse de certaines maladies (Kucuksezer *et al.*, 2021). En effet certains travaux suggèrent un rôle protecteur dans certaines maladies qui impliquerait une destruction directe des cellules dendritiques immatures et de lymphocytes auto-réactifs ou encore une sécrétion d'IL-10 qui bloquerait alors l'activation et les fonctions effectrices de ces derniers (M. Liu *et al.*, 2021). La Figure 16 résume cette ambivalence. Il subsiste en effet de nombreuses zones d'ombre quant à la fonction précise des cellules NK dans les maladies auto-immunes, en partie en raison d'une littérature parfois contradictoire et par les suggestions de fonctions des cellules NK variables selon l'avancement de la maladie (M. Liu *et al.*, 2021). Ainsi comprendre le rôle précis de ces cellules dans l'initiation, la progression voire la résolution de ces maladies constitue un enjeu de compréhension et thérapeutique majeurs (M. Liu *et al.*, 2021).

**Figure 16 : Résumé du rôle des cellules NK dans les maladies auto-immunes chez l'Homme (d'après M. Liu *et al.*, 2021).**



Comme développé ci-dessus, dans la grande majorité des cas leur rôle précis reste encore à élucider chez l'Homme. A notre connaissance une littérature encore plus pauvre est présente chez le chien. Seules quelques-unes des maladie auto-immunes (suspectées ou avérées) pour lesquelles les cellules NK ont un rôle avéré ou suspecté sont traitées dans les sections à venir. Une grande majorité d'entre-elles (maladie de Behçet, sclérose en plaque, sclérose multiple, polyarthrite rhumatoïde, psoriasis, lupus érythémateux systémique, diabète de type I, Parkinson (Harvey *et al.*, 2009; Kucuksezer *et al.*, 2021; Qi et Liu, 2023; Yang *et al.*, 2021)) ont été écartées selon des critères de niveau de preuve et de concision.

### a. Dermatite atopique

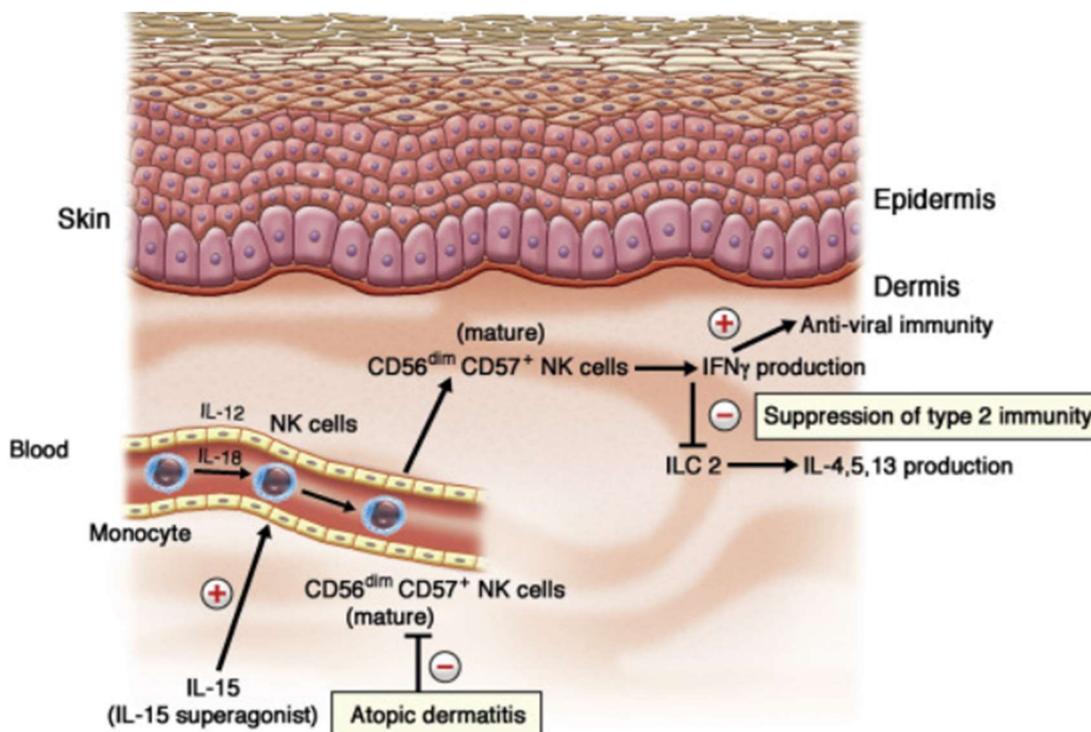
La dermatite atopique (DA) représente une des pathologies inflammatoires non infectieuses de la peau les plus communes au monde (Kabashima et Weidinger, 2020; Sroka-Tomaszewska et Trzeciak, 2021). Il s'agit d'une affection chronique et récurrente dont les principaux symptômes sont du prurit, de l'érythème, des papules, des lésions exsudatives et de la xérose cutanée pouvant aboutir au long cours à de la lichénification. Du point de vue de la pathogénie, la maladie est caractérisée chez l'Homme par une production élevée de cytokines au travers des lymphocytes Th2 (IL 4, 5 et 13)(Min *et al.*, 2022) mais il est également à noter l'influence récemment mise en évidence de basophiles ou encore d'ILC2s. On retrouve de fait une infiltration dermique d'ILC2s chez les patients atteints de dermatite atopique, où ces derniers sécrètent des cytokines pro-allergiques (Mack *et al.*, 2020; Sroka-Tomaszewska et Trzeciak, 2021). Si plusieurs études ont mis en évidence de multiples anomalies dans les populations de cellules NK systémiques de patients atteints de DA, leur nature précise et leur implication dans la maladie restent à élucider (Mack *et al.*, 2020). Il a été mis en évidence une diminution quantitative des cellules NK CD56dim périphériques sanguines chez les patients atteints de cette affection et une augmentation de leur expression de gènes d'apoptose (Mack *et al.*, 2020). De plus, on retrouve dans la peau lésionnelle comme non lésionnelle des

patients, une forte dérégulation des marqueurs des cellules NK avec notamment un déséquilibre d'expression des récepteurs inhibiteurs et activateurs (Möbus *et al.*, 2021). Une autre étude mentionne quant à elle une accumulation de cellules NK dysfonctionnelles caractérisées par le marqueur NKG2Dlow et associées une dysfonction de la barrière cutanée chez l'enfant (Ochayon *et al.*, 2023). L'hypothèse de ligands solubles au NKG2D induits par les allergènes pourraient expliquer cette dérégulation (Ochayon *et al.*, 2023).

Il a été démontré chez la souris qu'une diminution du taux quantitatif de cellules NK était associée à une exacerbation de la réponse pathogène des cellules ILC2s, suggérant ainsi un rôle régulateur de ces cellules lors de dermatite atopique (Mack *et al.*, 2020) (Figure 17). Cette hypothèse est appuyée par une étude qui a démontré *in vitro* une inhibition de la prolifération d'ILC2s et des cytokines associées par les cellules NK par le biais de l'IFN $\alpha$  ou encore de l'acide polyinosinique-polycytidylique (un agent activateur des cellules NK). Il a résulté de ces découvertes la mise en évidence d'une régulation négative des ILC2s par les cellules NK lors d'inflammation pulmonaire débutante (Bi *et al.*, 2017). De plus une étude a montré chez des souris chez lesquelles ont été induite une DA, qu'une population de cellules NK de sous-type CD1dhighPD-L1highCD27+ et produisant du TGF $\beta$ , était quantitativement moindre dans le sang, la rate et les nœuds lymphatiques de ces souris, mais augmentée dans les tissus auriculaires. Une transfusion de ces cellules a résulté en une chute significative du nombre d'ILC2s et de lymphocytes Th2. Le ratio Treg/Th2 était augmenté, suggérant un lien chez l'homme entre l'état fonctionnel de la sous-population de cellules NK sécrétant de larges quantités de TGF $\beta$  et la sévérité de l'affection (Min *et al.*, 2022). Ainsi, il est donc envisagé que la déplétion systémique en cellules NK retrouvée chez les patients atteints de DA contribue à l'inflammation et aux lésions cutanées retrouvées dans cette maladie. Enfin la restauration observée du nombre de cellules NK à la suite du blocage des cytokines produites par les ILC2s, suggère que la réduction initialement observée pourrait être imputable à l'inflammation allergique médiée, créant ainsi un cercle vicieux (Mack *et al.*, 2020). Ces résultats suggèrent qu'une diminution quantitative des cellules NK et de leurs fonctions pourrait constituer un facteur de risque prédisposant à l'apparition de DA chez l'Homme et que la restauration de ce déficit pourrait présenter un intérêt thérapeutique, comme cela a été démontré lors d'administration d'IL15 dans un modèle murin (Mack *et al.*, 2020; Möbus *et al.*, 2021).

Si la dermatite atopique est également décrite chez le chien, seule une étude fait mention d'expressions augmentées de 13 gènes associés à la mort cellulaire induite par activation (AICD) chez les cellules NK de chiens atteints de DA (Kuendee *et al.*, 2021).

Figure 17 : Schéma de l'axe inhibiteur des cellules NK humaines sur les ILC2s tel que proposé par Mack *et al* (d'après Kabashima et Weidinger, 2020).



### b. Affections hépatiques :

- Généralités

Le foie est enrichi en cellules NK qui présentent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles différentes des cellules NK périphériques. Le mécanisme derrière cette recrudescence et ces singularités reste inconnu, mais l'influence de chimiokines produites par le foie est suspectée dans le recrutement des cellules NK (M. Liu *et al.*, 2021 ; Maghazachi, 2010), en plus d'une interaction entre les différentes populations cellulaires au sein de cet organe (Tian *et al.*, 2013). On distingue chez l'Homme trois maladies auto-immune du foie principales : la cholangite primaire (PBC), la cholangite sclérosante primitive (PSC), et l'hépatite auto-immune (AIH) (Highton *et al.*, 2021; M. Liu *et al.*, 2021). Ces trois entités, bien que partageant des aspects pathogéniques communs, se traduisent par des atteintes hépatiques distinctes (Xiao *et al.*, 2018).

- La cholangite primaire

Dans le cadre de la PBC, les lésions infligées aux voies biliaires peuvent mener à une cirrhose de ces voies ainsi qu'à une destruction des espaces portes (M. Liu *et al.*, 2021). Un des mécanismes intervenant dans la pathogénèse de l'affection repose sur l'expansion de cellules NK aberrantes capables de détruire les cholangiocytes autologues (Gershwin *et al.*, 2000; Mikulak *et al.*, 2019). Il a été démontré que lors d'un ratio cellules NK/cellules épithéliales biliaires (BECs) haut, les cellules NK attaquaient les BECs, induisant alors le relargage d'autoantigènes pouvant activer les lymphocytes T auto-réactifs en présence de cellules présentatrices d'antigènes. D'autre part, lors d'un ratio NK/BECs faible, les cellules NK n'attaquaient pas les BEC mais sécrétaient d'importantes

quantités d'IFN $\gamma$ , induisant l'expression d'HLA de classe I et II sur les BECs, les protégeant alors d'une cytolyse lors d'exposition à des cellules NK auto-réactives (Shimoda *et al.*, 2015).

- *La cholangite sclérosante primitive*

Dans le cadre de la cholangite sclérosante primitive (CSP), les canaux hépatiques sont ciblés, aboutissant alors à une obstruction de l'arbre biliaire, une cirrhose voire une hypertension portale (M. Liu *et al.*, 2021). Des trois affections traitées dans cette partie le CSP est celle dont la pathogénèse est la moins bien décrite (Mikulak *et al.*, 2019), bien qu'une influence péjorative des cellules NK, directe ou non, soit suspectée. En effet des recherches ont montré que l'expression de ligands du KIR était significativement réduite chez les patients atteints de CSP tandis que celle de ligands activateurs était surexprimée (M. Liu *et al.*, 2021).

- *L'hépatite auto-immune*

Il s'agit d'une inflammation chronique du parenchyme hépatique par une réponse auto-immune dirigée contre les hépatocytes et dont l'étiologie précise n'est pas encore pleinement élucidée bien qu'un rôle prépondérant des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Xiao *et al.*, 2018), ainsi qu'un rôle trouble des cellules NK, ait été rapporté (M. Liu *et al.*, 2021). Une étude a mis en évidence qu'une diminution du taux de cellules NK périphériques CD56dim était négativement corrélée à l'évolution de la maladie chez les patients atteints d'AIH (M. Liu *et al.*, 2021). L'administration *in vivo* d'acide polyinosinique-polycytidylique (molécule possédant une activité de stimulation immune pléiotrope (Kunzmann *et al.*, 2004)) chez des souris, a induit une hépatite auto-immune au sein de laquelle les cellules NK hépatiques avaient activement contribué aux lésions tissulaires (Strassburg *et al.*, 2000).

### **c. Maladie d'Alzheimer/Dysfonctionnement cognitif canin**

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie dégénérative retrouvée chez l'Homme et caractérisée par une inflammation chronique du tissu nerveux associée à une mort neuronale sélective médiée en partie par une dérégulation des cellules gliales dont le mécanisme précis présente actuellement des zones d'ombres (Jadidi-Niaragh *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2020). Si l'étiologie précise reste en effet encore à déterminer, l'influence de facteurs environnementaux et génétiques est aujourd'hui fortement suspectée (Jadidi-Niaragh *et al.*, 2012). Il a été de plus été mis en évidence une implication de cellules non gliales dans la pathogénèse de la MA, et plus particulièrement de cellules du système immunitaire. En effet l'implication des granulocytes neutrophiles dans le déclin cognitif lors de MA a été mis en évidence dans un modèle murin. *A contrario*, d'autres travaux prêtent aux ILC2s des propriétés de soulagement du déclin cognitif associé à l'âge en dépit de modalités précises encore obscures (Zhang *et al.*, 2020).

Une implication des cellules NK vis-à-vis de l'inflammation tissulaire et des fonctions cognitives a été mise en évidence dans un modèle murin. En effet chez ces souris, la déplétion en cellules NK a mené à une diminution de l'inflammation tissulaire, une stimulation de la neurogénèse et une amélioration des fonctions cognitives sans modification pour autant de la concentration en amyloïde- $\beta$  ni de la capacité phagocytaire des microglies par rapport à cette dernière (Zhang *et al.*,

2020). Par ailleurs les cellules NK retrouvées dans le tissu nerveux intracrânien se caractérisaient par une faible production de TNF et de cytokines avec un profil cytotoxique et une hyper-activation. Cette dernière pourrait s'expliquer par la présence d'un micro-environnement inflammatoire propice à l'activation avec notamment une expression accrue d'IL 18 (chez l'Homme comme chez la souris) ou encore la fixation directe d'oligomères d'amyloïde- $\beta$  sur les TLR de ces lymphocytes (Zhang *et al.*, 2020). *A contrario*, d'autres recherches chez des souris mutantes pour les protéines APP/PS1 ont établi que l'apport de cellules NK spléniques était associé par la suite à une réduction des dépôts d'amyloïde- $\beta$  dans le cortex et le gyrus dentelé de ces souris ainsi qu'à une amélioration des fonctions cognitives de ces dernières. Un séquençage ADN a mis évidence une régulation négative des gènes associés à l'homéostasie et la maladie des microglies par la suite, suggérant alors l'intérêt thérapeutique des cellules NK dans cette affection (Hwang *et al.*, 2022).

Chez l'Homme, ont été mis en évidence une quantité ainsi qu'une activité cytotoxique réduite dans le sang de patients atteints de la maladie par rapports aux individus sains (Qi *et al.*, 2022). Une autre étude fait elle, mention d'une augmentation de l'expression du CD16 chez les cellules NK périphériques (Qi et Liu, 2023). Les travaux de l'équipe de Qi *et al.* (2023) ont mis en évidence la présence d'une sous-population spécifique de cellules NK1 (Tableau 2) exprimant de nombreux facteurs de transcription (tels que TBX21, NFATC2 and SMAD3) et négativement corrélée au déclin cognitif lié à la maladie d'Alzheimer (Qi *et al.*, 2022) (Tableau 2).

**Tableau 2 : Classification des cellules NK sanguines chez les patients atteints de MA (d'après Qi *et al.*, 2022).** Les 10 gènes les plus fréquemment exprimés sont retrouvés dans la partie « top 10 ». Les protéines sécrétées sont en bleu, les éléments membranaires sont en rouge et les facteurs de transcription sont en vert.

	Top 10	Secreted protein	Cell membrane	Transcription Factor				
NK0	FCER1G	CD160	SPON2	GZMM	CD160	PPP1R15A	FOS	ZBTB16
	SPON2	FOS	PTGDS	GSN	CD69	C1orf162	NR4A2	TSC22D3
	CD69	PTGDS	GZMB	IFNG	FCER1G	CD7		
	KLRB1	MIR24-2			KLRB1	CD38		
NK1	TMIGD2	NR4A2			TMIGD2	CLIC3		
	MYOM2	ZFP36L2	IGFBP7	KIR2DL2	LAMP1	CX3CR1	TBX21	ZFP36L2
	DUSP1	IGFBP7	RCN2		C20orf24	LPCAT1	YBX1	ASCL2
	PNRC1	YBX1			HLA-C	ITGB7	XBP1	KLF3
	CYBA	TBX21			DNAJC1	CMTM3	CEBPB	KLF2
NK2	BTG1	RPS2			SUN2	TMEM160		
	CD3E	HLA-DPA1	GZMH	CCL5	CD3E	HLA-DPB1	ZBTB38	
	HLA-DRB1	VIM	IL32	HLA-DPA1	KLRC3	TIGIT		
	GZMH	HLA-DPB1			CD74	LIME1		
NK3	CCL5	KLRC3						
	IL32	S100A6						
	GZMK	CD44	XCL1	AREG	SELL	LTB	FOS	TCF7
	SELL	SPTSSB	GZMK	XCL2	IL7R	GPR183	GATA3	FOSB
	IL7R	FOS			CD44	TMEM123		
XCL1	IFITM3			SPTSSB	KLRC1			
DUSP2	AREG			IFITM3	IER3			

#### d. Myasthenia gravis

La myasthenia gravis représente une des maladies neuromusculaires les plus communes chez le chien, caractérisée par la présence d'auto-anticorps produits par les lymphocytes B, fixés par le complément et dirigés contre les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine. L'étiologie est également commune, entre autres, à l'Homme et aux rongeurs (Ge *et al.*, 2023). Plusieurs formes sont décrites chez le chien, incluant une forme localisée intéressant les muscles de l'œsophage et/ou de la sphère oro-pharyngée ou encore une atteinte systémique de multiples muscles striés, voire les deux formes combinées (Forgash *et al.*, 2021).

Une étude a établi chez l'Homme que les patients atteints de myasthenia gravis avec des épisodes aigus détenaient un nombre réduit de cellules NK circulantes totales, et plus particulièrement celles de phénotype CD56dim ainsi que celles produisant de l'IFN $\gamma$  (Ge *et al.*, 2023). Ce postulat n'est en revanche pas retrouvé dans une autre étude qui mettait en évidence une expression moindre de NKG2D chez les cellules NK périphériques des patients atteints de myasthenia gravis (Liu *et al.*, 2021), tandis que les cellules NK CXCR5+ étaient significativement augmentées en quantité. Ces dernières exprimaient de plus grandes quantités d'ICOS (récepteur médiant entre autres la libération d'anticorps par les lymphocytes B) et de PD-1, et produisaient moins d'IFN $\gamma$  que les cellules NK CXCR5-. Par ailleurs le nombre de cellules NK CXCR5+ était positivement corrélé à la quantité de lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) et le taux d'anticorps dirigés contre les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine circulants. L'équipe de Liu *et al.* (2021) a mis en évidence un défaut de suppression des lymphocytes T autologues et des Tfh par les cellules NK, et une activation et différenciation augmentée des Tfh par le biais de ces mêmes cellules. De plus dans l'étude de Ge *et al.* (2023) les cellules NK CXCR5- inhibaient la différenciation des plasmablastes, tandis que les cellules NK CXCR5+ promouvaient plus efficacement la prolifération des lymphocytes B. Il a ainsi été suspecté l'influence des cellules NK CXCR5+ dans la pathogénèse de la myasthenia gravis et la possibilité qu'il s'agisse d'un nouveau type de lymphocyte folliculaire helper (Ge *et al.*, 2023).

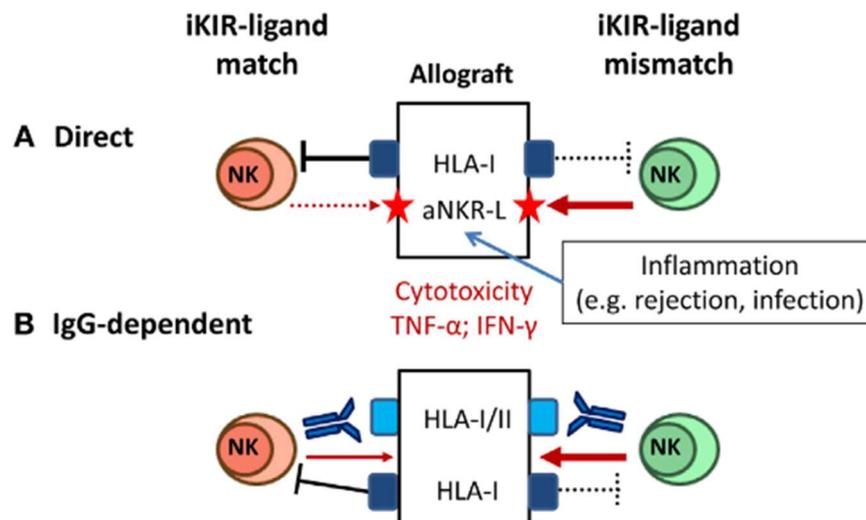
### **C. Implications dans le processus de rejet de greffe**

La greffe d'organes solides représente l'option thérapeutique de choix pour beaucoup d'organes en stade d'insuffisance terminale. En dépit d'améliorations notables des taux de rejet aigu des greffes au fil du temps par le biais des soins apportés aux patients, de l'immunodépression induite ou de la sensibilité diagnostique, ces différentes méthodes ne permettent pas d'amélioration franche de la survie de la greffe à long terme (O'Neill et Hidalgo, 2021). Le rejet d'allogreffes représente une des complications majeures lors de transplantations d'organe solides (López-Botet *et al.*, 2017). S'il a longtemps été admis que les cellules NK n'avaient pas de contribution particulière dans la phase de rejet aiguë (Benichou *et al.*, 2011), différentes études ont récemment remis ce postulat en question (Benichou *et al.*, 2011; López-Botet *et al.*, 2017) avec la mise en évidence d'une activation de cellules NK peu de temps après une transplantation allogénique (a contrario des transplantations autogéniques) pouvant ainsi contribuer à l'allo-réponse à médiation cellulaire et au processus de rejet aigu (Benichou *et al.*, 2011).

Il est démontré au travers de biopsies rénales et de modèles expérimentaux que les cellules NK contribuent au rejet de greffe médié par les anticorps (ABMR) chronique (López-Botet *et al.*, 2017). Les anticorps anti-HLA du donneur (DSA) créés par le système immunitaire de l'hôte, en plus d'activer le système du complément, peuvent déclencher les cellules NK qui au travers du CD16 enclenchent la production de cytokines et l'activation d'ADCC (López-Botet *et al.*, 2017) (Figure 18). L'engagement des cellules NK médiées par le DSA lié aux cibles endothéliales initie alors une cascade pro-inflammatoire aboutissant à un recrutement d'autres cellules NK ainsi que de monocytes (O'Neill et Hidalgo, 2021). Il en résulte de fait une micro vascularite de la greffe caractéristique des ABMR (O'Neill et Hidalgo, 2021). De plus un nombre élevé de cellules CD56+ a été observé dans les lésions de greffe des patients souffrant d'ABMR (López-Botet *et al.*, 2017). Des dérégulations du CD16 et l'expression de marqueurs d'activation ont été observées dans les cellules NK circulantes de patient ayant subi une greffe rénale.

Il est également à noter que l'absence de reconnaissance du « soi » par les cellules NK provoque également une micro-vascularite indépendante cette fois-ci du mécanisme induit par les anticorps. Cela présuppose en revanche une activation conjointe des récepteurs activateurs au travers des potentiels ligands fournis par la greffe. Il est estimé qu'un mésappariement entre le KIR du donneur et le ligand de la greffe est présent dans 50 à 75% des cas de transplantations rénales non identiques du point de vue de l'HLA. Il existe à l'heure actuelle un désaccord sur l'influence de ce mésappariement sur un éventuel rejet à court terme de greffes rénales (López-Botet *et al.*, 2017). Par ailleurs les cellules NK influencent la maturation des cellules dendritiques et par conséquent l'activation de lymphocytes T, d'autant que des biopsies rénales de transplantation rénales rejetées chez l'Homme ont mis en évidence une augmentation du nombre absolu de cellules CD56bright (Killey *et al.*, 2019). De plus elles produisent de façon précoce de l'IFN $\gamma$  qui module une réponse de type Th1 (Pontrelli *et al.*, 2020). Enfin les interactions avec les lymphocytes T CD4+ augmente la réactivité de cellules NK, aboutissant potentiellement à des mécanismes de rejets aigus de greffe (Ito *et al.*, 2008; Killey *et al.*, 2019; Pontrelli *et al.*, 2020).

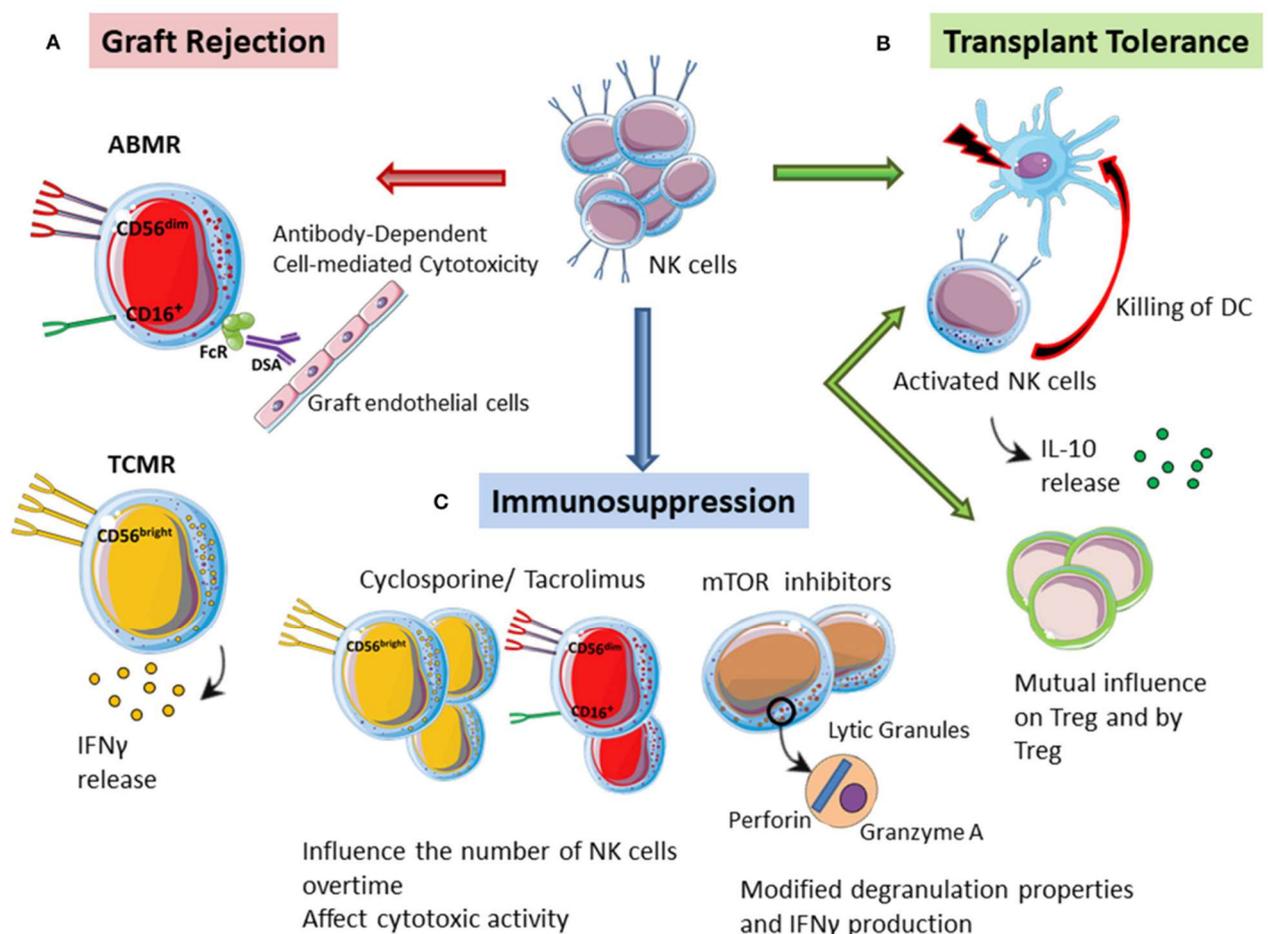
**Figure 18 : Mécanismes d'alloréactivité des cellules NK dans la cadre de greffe d'organe solide (d'après López-Botet *et al.*, 2017).** (A) Les cellules NK déficientes en KIR inhibiteur (iKIR) spécifiques de la classe d'HLA du donneur peuvent potentiellement médier une production cytokinique et une cytotoxicité dirigée contre l'allogreffe. L'alloréactivité des cellules NK est favorisée par des conditions cellulaires stressantes (comme des stimuli pro-inflammatoires) induisant l'expression par la greffe de ligands pour les récepteurs activateurs des lymphocytes NK (NKR). (B) : Les allo-anticorps spécifiques du donneur (DSA) déclenchent l'ADCC et une production cytokinique contre l'allogreffe, surpassant le potentiel contrôle par l'iKIR (gauche) et un mésappariement entre le KIR et son ligand amplifie cette réponse (à droite).



En dépit de leur rôle dans le rejet d'allogreffes, les cellules NK sont également en mesure de promouvoir la tolérance envers ces mêmes greffes (Beilke *et al.*, 2005). Il a par exemple été démontré chez des souris ayant subi une greffe de peau que les cellules NK du donneur induisaient une tolérance au greffon en tuant les cellules présentatrices d'antigène allogéniques (Pontrelli *et al.*, 2020). De plus un lien entre la tolérance de greffe et la production d'IL10 est mis en cause. Sous stimulation par des glycolipides, les cellules NK produisent de grandes quantités d'IL10 qui promeut le développement de cellules dendritiques régulatrices (Figure 19)(Kojo *et al.*, 2005). Aussi dans une étude, les souris tolérantes aux greffes détenaient d'importants taux d'IL10 (Pontrelli *et al.*,

2020). Par ailleurs, dans une autre étude, les cellules NK de patients connaissant une tolérance spontanée à des greffons rénaux se caractérisaient par un profil transcriptionnel particulier. Il a été montré que les cellules NK des patients connaissant une tolérance spontanée, présentaient un profil activateur réduit avec une expression moindre des gènes codant pour KIR2DS5, NKp46, and CD16, avec par conséquent une réduction des fonctions effectrices de ces cellules (Dugast *et al.*, 2017; Lozano *et al.*, 2011; Pontrelli *et al.*, 2020). Il est aussi suspecté qu'une certaine sous population de cellules NK caractérisée par un phénotype NKG2Cbright joue un rôle compensatoire de défense contre le cytomégalovirus humain (HCMV) dans le cadre de transplantation rénale chez des patients infectés, compensant alors les effets de l'immunosuppression sur les lymphocytes T (López-Botet *et al.*, 2017). Le cytomégalovirus humain (HCMV) est un herpesvirus responsable d'infections à vie très fréquentes chez l'Homme, en général asymptomatiques chez les individus immunocompétents. Le virus a la capacité d'entrer en latence, se réactivant de manière occasionnelle, permettant alors une transmission par le biais des sécrétions de l'organisme (López-Botet *et al.*, 2017). L'infection par ce virus constitue un facteur de risque de vasculopathie associée à une insuffisance chronique de la greffe dans le cadre de transplantations cardiaques ou rénales, et est directement associée au taux de rejet de greffe et à un temps de survie réduit (Sagedal *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2002).

**Figure 19 : Les multiples rôles des cellules NK dans la transplantation rénale (d'après Pontrelli *et al.*, 2020).** (A) Rejet de la greffe. Les cellules NK CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup> peuvent favoriser la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) contre la greffe en interagissant avec les DSA liés aux cellules endothéliales de la greffe, entraînant ainsi un rejet médié par les anticorps (ABMR). En revanche, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> peuvent jouer un rôle spécifique dans le rejet médié par les lymphocytes T (TCMR) par la sécrétion de molécules pro-inflammatoires telles que l'IFN $\gamma$ . (B) Tolérance à la greffe. Les cellules NK activées peuvent directement tuer les cellules dendritiques d'origine donneuse, favorisant ainsi la tolérance à la greffe. Dans les modèles murins de tolérance, les cellules NK peuvent également produire des niveaux élevés d'IL10, montrant ainsi une capacité tolérogène. Les cellules NK et les lymphocytes T régulateurs (Tregs) pourraient également s'influencer mutuellement par un antagonisme réciproque ou par une définition temporaire de leur contribution à l'induction de la tolérance à la greffe. (C) Immunosuppression. Les médicaments immunosuppresseurs pourraient moduler le phénotype des cellules NK, qui peuvent conserver leur capacité à répondre à la stimulation. De plus, l'immunosuppression peut réduire le nombre de cellules NK après une transplantation rénale. La surveillance du nombre et des fonctions des cellules NK chez les patients transplantés sous des régimes immunosuppresseurs spécifiques est importante pour contrôler et prédire l'apparition d'infections et de néoplasies.



Un manque de littérature est à noter chez le chien, bien que l'influence de cellules NK activées dans le rejet de greffe soit également suspectée (Graves et Storb, 2020). Une étude a mis en évidence l'incapacité de cellules cytotoxiques CD94<sup>+</sup> (marqueur partagé par les lymphocytes NK et NKT) à promouvoir une tolérance et prévenir d'un rejet de greffe chez des chiens recevant des greffes de moelle osseuse, sur un nombre certes faible d'individus (n=5) (Abrams *et al.*, 2020). Enfin un essai comparant les effets de l'injection de cellules NK et de PBMCs canines chez des souris, a mis en évidence de nombreuses lésions tissulaires secondaires à l'injection de PBMCs au sein

desquelles ces dernières sont retrouvées, tandis qu'une absence de lésions et de signes cliniques étaient à signaler dans la cadre d'injection de cellules NK seules. L'équipe a conclu que ces résultats suggèrent que les cellules NK canines ne causent pas d'effets secondaires significatifs lors de greffe et que des cellules NK allogéniques pourraient être utilisées de façon sécuritaire en vue d'une immunothérapie tumorale chez le chien (Kim *et al.*, 2022).

#### **D. Les cellules NK et la gestation**

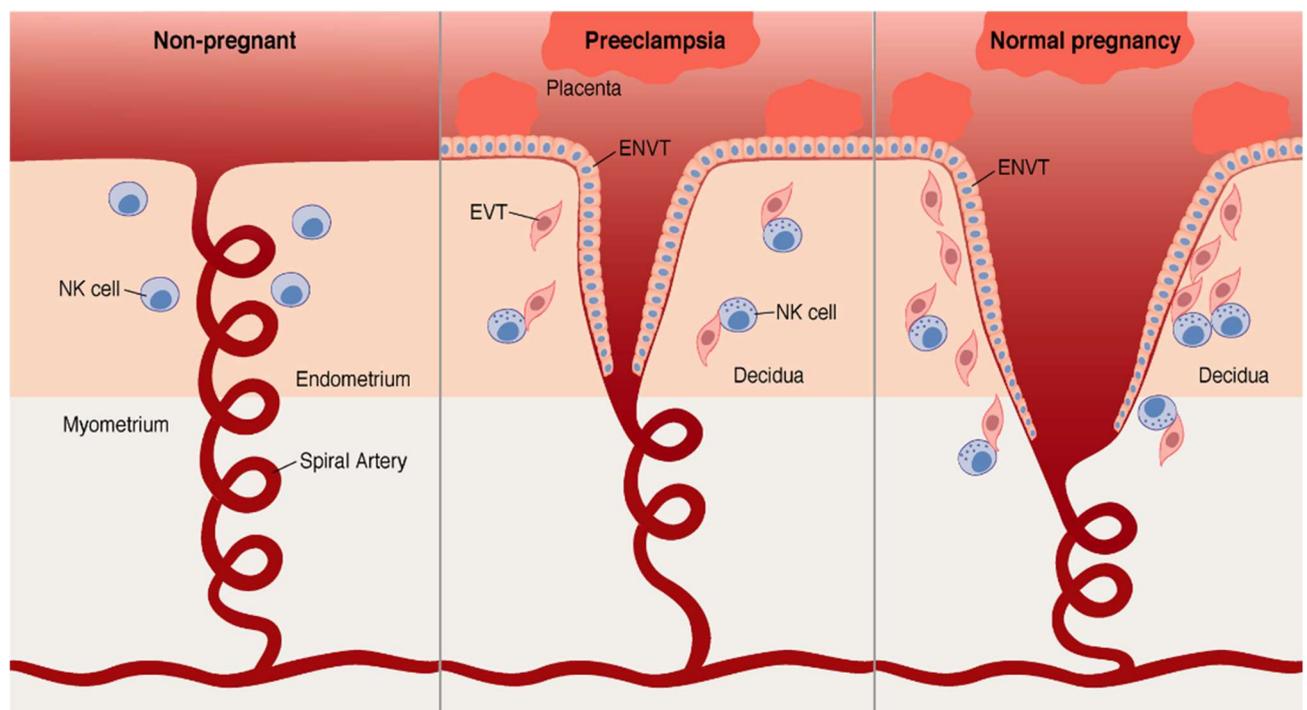
La viviparité des mammifères à placenta résulte d'une co-évolution avec le système immunitaire. La formation du placenta, organe nourricier, implique une coopération entre une population numériquement étendue et activée de cellules NK maternelles utérines (uNK), et de trophoblastes fœtaux extra-villeux (EVT) qui modulent l'apport sanguin. En effet on assiste lors de la gestation à un remodelage des vaisseaux sanguins de l'endomètre externe qui devient alors un tissu différencié appelé « decidua ». Ce remodelage est bien plus profond chez l'Homme que chez d'autres espèces (Faas et de Vos, 2017; Parham, 2004). La progestérone est un acteur majeur dans la mise en place de la decidua et de ses acteurs. Bien que les cellules NK utérines (uNK) soient dépourvues de récepteurs à la progestérone, des études ont montré que cette dernière induisait la production d'IL15 par les cellules endométriales avec pour conséquence une prolifération et une différenciation des cellules uNK. Par ailleurs, la fonction de ces cellules peut également être modulée par la progestérone et les oestrogènes. Les oestrogènes régulent directement la migration des uNK et induisent la sécrétion par ces dernières de CC motif ligand 2 (CCL2), augmentant ainsi la fonction angiogénique de ces dernières. En effet le CCL2 est une chimiokine produites par de nombreux types cellulaires au sein de l'organisme, avec des fonctions variées telles que l'induction macrophagique, la cicatrisation, la prolifération cellulaire ou encore l'angiogenèse dont le mécanisme précis reste à élucider (Peng *et al.*, 2023). Il a été rapporté une réaction croisée significative entre la progestérone et le récepteur aux glucocorticoïdes des cellules NK et il est suspecté que cette hormone puisse inhiber la production de TNF $\alpha$  par ce biais, menant alors à une tolérance immune en début de gestation (Zhang et Wei, 2021).

Par ailleurs, chez l'Homme les cellules NK déciduales (dNK), une sous-catégorie de cellules NK utérines, représentent entre 50 et 90 % des lymphocytes présents dans la decidua (Parham, 2004; Xie *et al.*, 2022). Ces cellules sont caractérisées par une forte expression du CD56 et une absence d'expression du CD16 (Faas et de Vos, 2017; Parham, 2004) et une étude a mis en évidence une surexpression d'au moins 278 gènes chez cette sous-population par rapport aux cellules NK périphériques. Il reste encore à déterminer si ces spécificités sont acquises au sein de la decidua ou si ces dernières proviennent de rares précurseurs périphériques atypiques (Faas et de Vos, 2017; Parham, 2004). En dépit de leur production de cytokines et de chimiokines induisant l'invasion trophoblastique, le remodelage tissulaire (Figure 20), le développement embryonnaire et la placentation (Zhang et Wei, 2021), la fonction exacte de ces dNK reste encore trouble (Faas et de Vos, 2017). Il a été démontré que ces cellules étaient douées de cytotoxicité bien que moindre par rapport aux cellules NK périphériques et non dirigée vers les trophoblastes extravilleux (Faas et de Vos, 2017). Ces derniers sont par ailleurs les seuls types de trophoblastes à exprimer des molécules du CMH de classe I, liant les récepteurs des cellules NK, et plus spécifiquement HLA-C (ligand de la famille des récepteurs KIR), HLA-E (ligand pour le CD94–NKG2A/C) et HLA-G (ligand

pour le récepteur LILRB1) (Parham, 2004; Sargent *et al.*, 2006). Trois sous-populations de cellules NK déciduales ont été mises en évidence et sont discriminées selon les marqueurs exprimés. Si toutes ces cellules expriment les marqueurs CD49A et CD9, seules les dNK1 expriment CD39, CYP26A1 et B4GALNT1, tandis que ANXA1 définit les dNK2. Les dNK3 expriment CD160, KLRB1 et CD103. Enfin ITGB2 est commun aux deux derniers types cellulaires cités (Vento-Tormo *et al.*, 2018). Ainsi il est suspecté que les dNK1 apportent un bénéfice lors de la grossesse au travers d'une modulation immunologique, tandis que les deux autres types pourraient interagir avec les autres cellules au sein de la decidua par le biais de facteurs tels que XCL-1, ce dernier médiant notamment l'attraction des cellules dendritiques et des trophoblastes (Shmeleva et Colucci, 2021).

La prééclampsie est un trouble spécifique à l'Homme se caractérisant par un remodelage incomplet des artères spiralées (Figure 20) intervenant dans la seconde moitié de 5 à 10% des grossesses et dont l'unique traitement consiste en la délivrance du fœtus (Parham, 2004). Une étiologie génétique a été mise en évidence avec plus spécifiquement la combinaison KIR maternel de génotype AA et un HLA de type C2 fœtal. En effet, en raison d'une liaison particulièrement forte un puissant signal inhibiteur est alors transmis aux cellules NK et à cela s'ajoute l'absence relative d'expression de récepteurs activateurs pouvant fournir des signaux compensatoires. Ces éléments convergent vers une pathogénie basée sur une inhibition excessive des cellules NK utérines menant à un arrêt prématuré du remodelage des vaisseaux sanguins maternels par les trophoblastes villosités, augmentant alors la probabilité de survenue d'une prééclampsie. Il ne s'agit en revanche pas d'une association binaire, en effet seule une minorité de grossesses avec des fœtus C2 et des mères AA mène à une prééclampsie, et toutes les prééclampsies ne sont pas caractérisées par cette association (Faas et de Vos, 2017; Parham, 2004). Si plusieurs études font état d'une dérégulation quantitative des cellules uNK dans le cadre de prééclampsie, en faisant une potentielle cible en vue d'une amélioration thérapeutique, les résultats obtenus sont contradictoires. (Zhang et Wei, 2021).

**Figure 20 : Remodelage des artères spiralées par les cellules NK et les trophoblastes extra-villoux dans divers cas de figure : absence de gestation à gauche, prééclampsie au centre, gestation physiologique à droite (d'après Parham, 2004).**

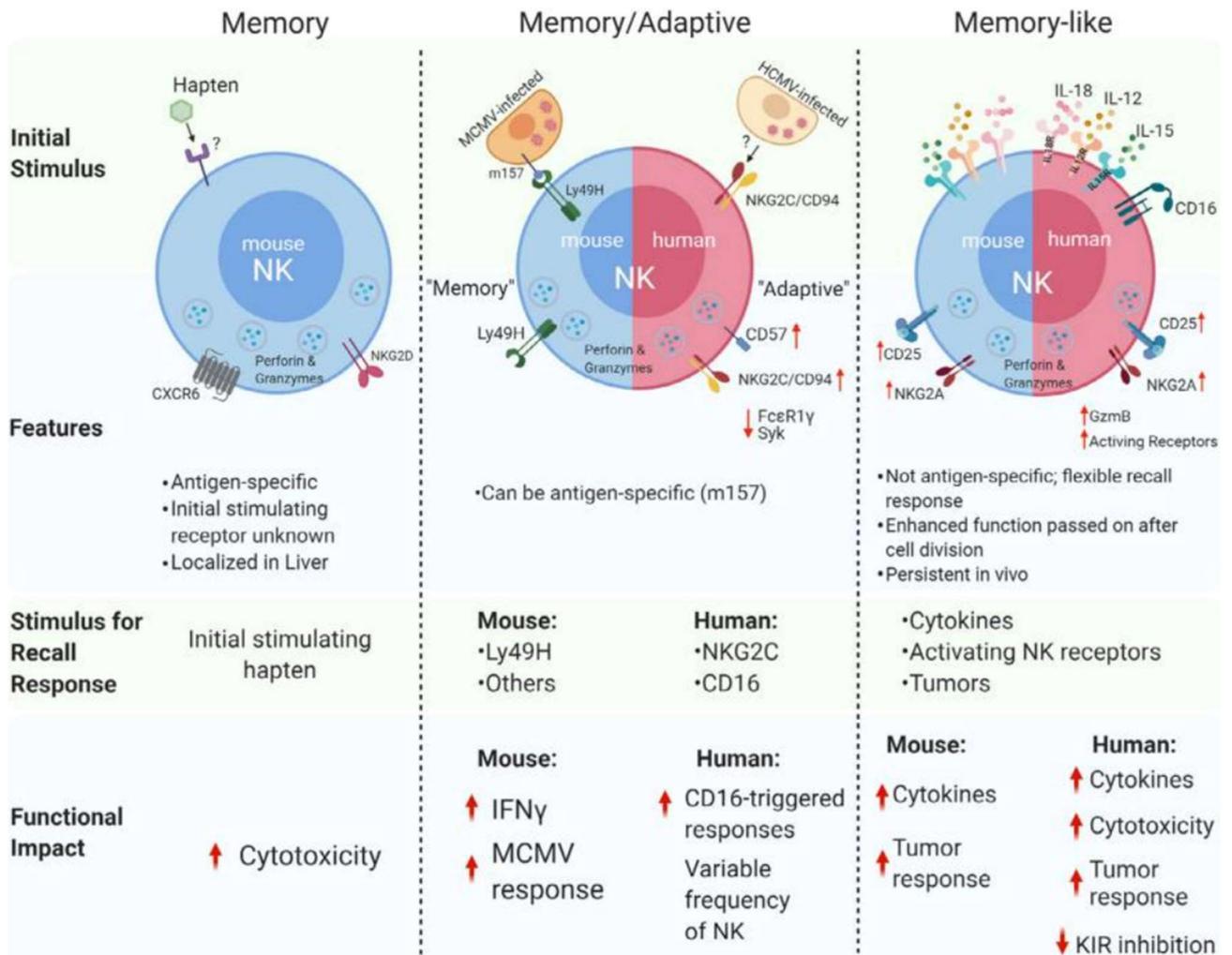


Une étude fait mention des cellules NK canines utérines en post-implantation et ces cellules ont été retrouvées autour des glandes utérines superficielles mais aussi profondes (Tavares Pereira *et al.*, 2021). En revanche, on peut supposer que la placentation endothélio-choriale de la chienne complique un éventuel parallélisme avec la femme.

### **E. Les cellules NK et le concept de mémoire**

Définie par l'habilité à reconnaître rapidement et à répondre plus vigoureusement à un pathogène préalablement rencontré, la mémoire immunologique fournit une immunité spécifique augmentée et sur la durée (Gang *et al.*, 2020). En dépit de la catégorisation initiale des cellules NK en tant que cellules immunitaires innées, plusieurs études ont démontré que ces dernières montraient des caractéristiques propres aux acteurs de l'immunité adaptative, telles que l'expansion clonale de cellules effectrices spécifiques d'un antigène et la génération de populations mémoires à longue survie capables d'une réponse augmentée en cas de représentation de l'antigène (Brillantes et Beaulieu, 2020). Plusieurs termes sont utilisés pour caractériser ces propriétés. Le terme de « mémoire » décrit une réponse augmentée ou a minima reprogrammée intrinsèque aux cellules en question, spécifique d'un antigène et durant dans le temps. Le terme « memory-like/pseudo-mémoire » caractérise une réponse des cellules NK où un ou plusieurs des critères sus-cités sont manquants ou non-établis (Brillantes et Beaulieu, 2020). On distingue ainsi chez les cellules NK la mémoire spécifique d'haptène, la mémoire/pseudo-mémoire spécifique de virus et enfin la « pseudo-mémoire » induite par les cytokines (Figure 21) (Cerwenka et Lanier, 2016; Gang *et al.*, 2020) dans un contexte qualifié de « trained immunity » (Brooks *et al.*, 2022). Plusieurs modalités de ce concept restent encore à élucider, bien que de nombreux espoirs thérapeutiques (dont la vaccination) reposent dessus (Brillantes et Beaulieu, 2020).

**Figure 21 : Résumé des différents types de réponse mémoire et « memory-like » des cellules NK (d'après Gang *et al.*, 2020).**



### a. La mémoire spécifique d'haptène

Un haptène est une molécule souvent de bas poids moléculaire, qui lorsqu'elle est combinée à une molécule porteuse peut induire une antigénicité (Brooks *et al.*, 2022). La capacité des cellules NK à développer une mémoire spécifique d'antigène a initialement été décrite dans le cadre d'hypersensibilités de contact avec des haptènes chimiques chez des cellules NK hépatiques de souris. D'autres expérimentations ont montré que cette fonction était dépendante de l'expression de CXCR6, un récepteur de chimiokines vital à la survie et l'homéostasie des cellules, bien que les mécanismes précis restent encore à élucider (Gang *et al.*, 2020).

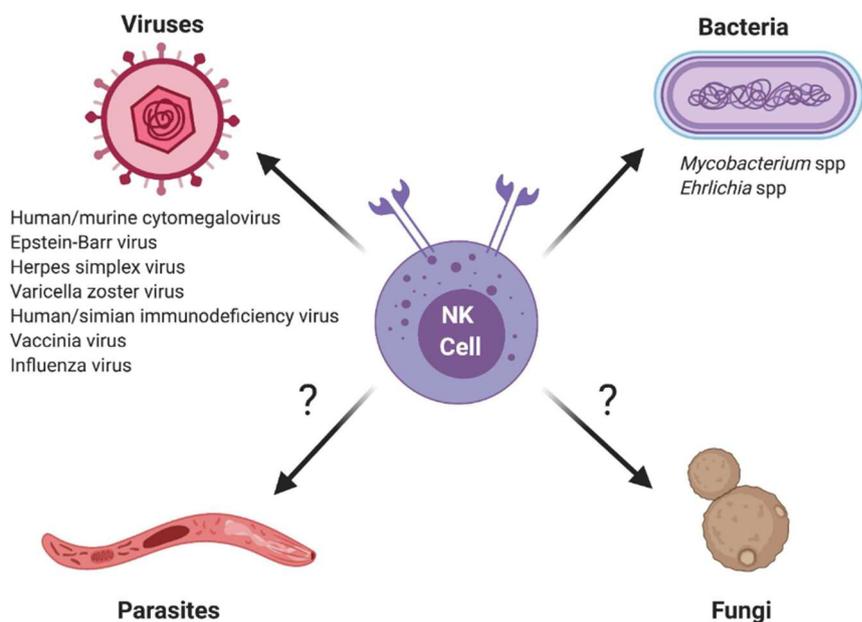
### b. L'immunité spécifique de virus

Une réponse mémoire spécifique d'antigène a d'abord été démontrée chez le cytomégalovirus murin, bien que par la suite une mémoire (ou pseudo-mémoire) ait également été démontrée ou suspectée concernant divers autres agents pathogènes (Brillantes et Beaulieu, 2020) (Figure 22).

Ce procédé peut être illustré avec l'exemple suivant du cytomégalovirus humain (HCMV). En effet une infection par ce virus résulte en une différenciation, prolifération et survie de cellules NK au phénotype CD94/NKG2C+ (López-Botet *et al.*, 2023). Dans un contexte de transplantation allogénique de moelle osseuse hématopoïétique, ces mêmes cellules NK CD94/NKG2C+ des donneurs séropositifs pour le HCMV, se multipliaient sélectivement à la suite d'une réactivation du HCMV associée à une forte production d'IFN $\gamma$ , bien qu'à un degré variable selon les individus (Brillantes et Beaulieu, 2020; Cichocki *et al.*, 2018). Ces cellules NK survivent dans l'organisme dans le temps et ultérieurement à l'élimination du HCMV circulant (Foley *et al.*, 2012). Il a également été montré que ces cellules réagissaient à l'UL40 (un peptide du HCMV) lorsque ce dernier est associé à l'HLA-E (un ligand du NKG2C).

Bien que de nombreux éléments indiquent que l'expansion de ces cellules NKG2C+ résulte d'un mécanisme spécifique, ce dernier reste encore à élucider (Brillantes et Beaulieu, 2020).

**Figure 22 : Schéma récapitulatif des réponses mémoires et « memory-like » des cellules NK envers différents pathogène (d'après Brillantes et Beaulieu, 2020).** Des points d'interrogations sont adressés en direction des pathogènes eucaryotes pour lesquels des investigations complémentaires sont nécessaires.



### c. Pseudo-mémoire induite par les cytokines

Il existe une forme de pseudo-mémoire induite par l'environnement cytokinique (Gang *et al.*, 2020). Des travaux ont mis en évidence que des cellules murines activées avec une combinaison de cytokines démontraient par la suite des propriétés de pseudo-mémoire (Cooper *et al.*, 2009b). En effet des cellules NK soumises à une stimulation cytokinique (IL 12, 15 et 18) ont produit d'importantes quantités d'IFN $\gamma$ . Ces mêmes cellules une fois transférées dans des souris syngéniques étaient entrées en état de repos une semaine après transfert. Après restimulation, ces dernières exprimaient significativement plus d'IFN $\gamma$  que les cellules contrôles ou encore que celles des souris hôtes (Cooper *et al.*, 2009b; Gang *et al.*, 2020). Cette capacité à produire plus d'IFN $\gamma$  était indépendante d'une éventuelle prolifération, intrinsèque à ces cellules et a persisté après

mitose (Cooper *et al.*, 2009a). Cette « pseudo-mémoire » a également été établie chez l'Homme au travers d'expériences similaires où on note également une importante prolifération après restimulation (Romee *et al.*, 2012). En termes de potentielles applications de cette découverte, il a été démontré *in vivo* chez la souris que les cellules NK activées par les mêmes combinaisons précédentes détenaient de plus fortes fonctions effectrices contre les processus néoplasiques (Gang *et al.*, 2020). De même il a été noté des fonctions intéressantes dans le cadre du rejet de greffe chez la souris (Gang *et al.*, 2020; Hüber *et al.*, 2015).

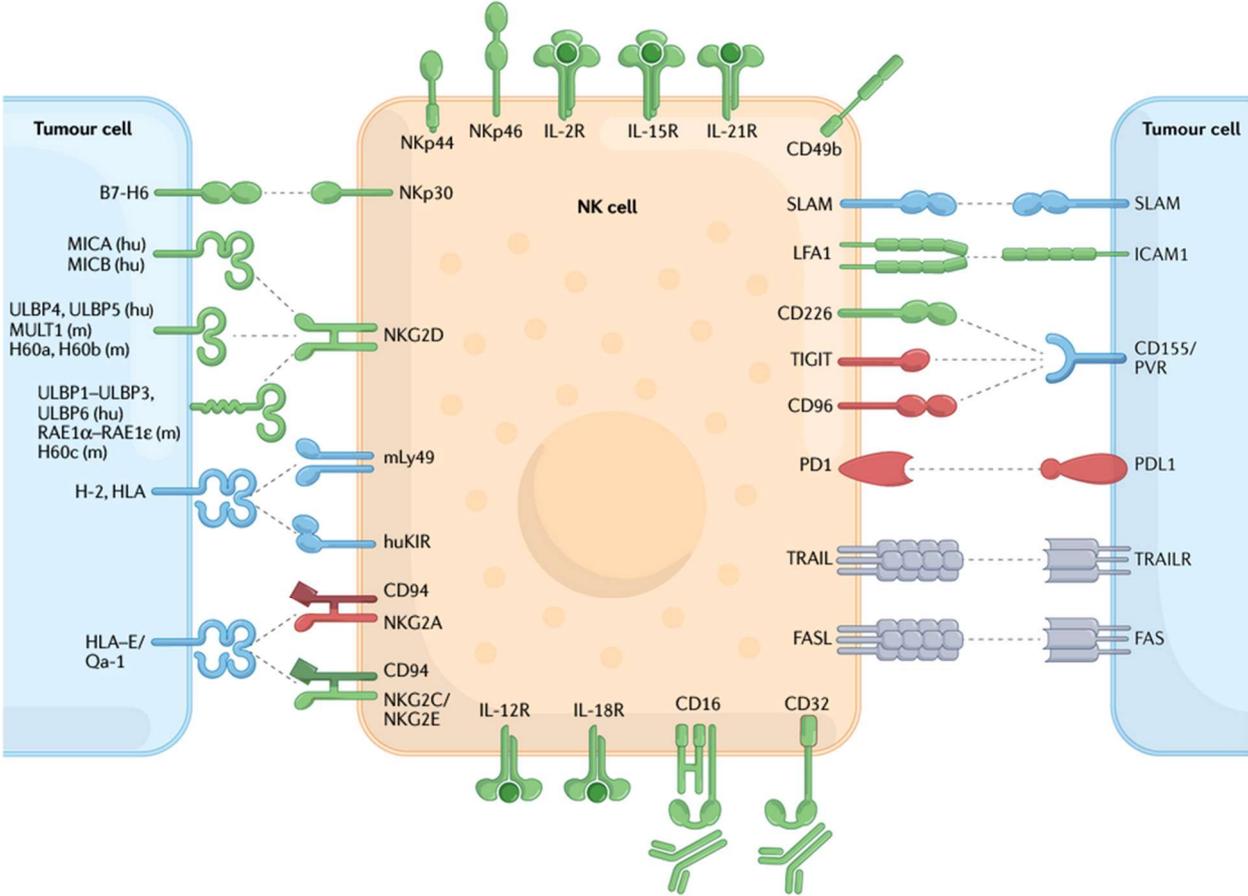
Un manque de littérature concernant le potentiel de mémoire ou de pseudo-mémoire des cellules NK est à signaler concernant le chien.

## **F. Les cellules NK et les processus néoplasiques**

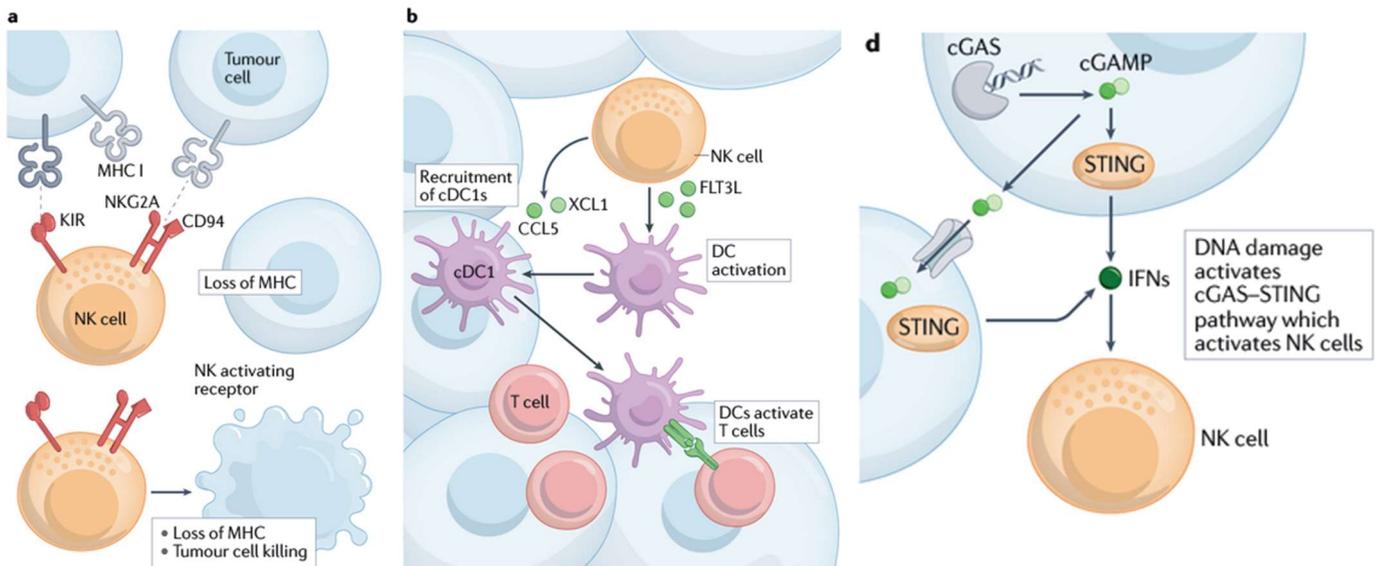
### ***a. Implications anti-tumorales des cellules NK***

Les cellules NK exercent leur rôle anti-tumoral au travers d'un mode d'action à la fois direct et indirect. En effet, on note dans ce cadre la libération de granules contenant de la perforine et des granzymes, couplée à la libération de molécules effectrices comme l'IFN $\gamma$ , à la liaison de l'activation de récepteurs de la mort et d'ADCC (Corvino *et al.*, 2022). La Figure 23 résume les différents récepteurs et leurs ligands impliqués dans l'immunité anti-tumorale. Il a été démontré l'influence de voies de signalisation activatrices, et plus particulièrement de la voie cGAS–STING mise en évidence chez la souris. En effet cGAS est une enzyme cytosolique capable de détecter l'ADN qui, lorsqu'elle rencontre ce dernier dans le cytosol, catalyse la synthèse de cGAS GMP–AMP 2'3'-cyclique (2'3'-cGAMP) (Ablasser et Chen, 2019). Une fois généré, ce second messager se lie et active une protéine du réticulum endoplasmique (STING), ce qui, par le biais d'autres cascades moléculaires, aboutit à la transcription de gènes codant pour des interférons de type I ainsi que pour diverses cytokines et chimiokines (Figure 24) (Barber, 2015; Wolf *et al.*, 2023). De plus, la libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines enclenche le recrutement et la maturation d'éléments de la réponse immunitaire adaptative, tels que les lymphocytes T et les cellules dendritiques (Kisseberth et Lee, 2021; Wolf *et al.*, 2023) (Figure 24). Ainsi de nombreuses études associent l'infiltration tumorale de cellules NK à un facteur pronostic positif dans de multiples processus néoplasiques (Nersesian *et al.*, 2021; Wolf *et al.*, 2023), bien que l'inverse ait également été décrit avec une potentielle influence du phénotype desdites cellules (Corvino *et al.*, 2022).

**Figure 23 : La fonction des cellules NK est régulée par des récepteurs de surface et des cytokines (d'après Wolf et al., 2023).** Les interactions qui activent (en vert) ou inhibent (rouge) la réponse des cellules NK envers des tumeurs ou d'autres cellules sont représentées. D'autres interactions détiennent une fonction mixte (en bleu) en fonction du sous-type de récepteur ou du contexte. Certains ligands peuvent lier des récepteurs tant inhibiteurs qu'activateurs. Les récepteurs SLAM peuvent aboutir à des signaux activateurs ou inhibiteurs en fonction des protéines adaptatrices exprimées par les cellules NK. Les principaux récepteurs cytokiniques d'intérêt sont également schématisés. 'Hu' indique une caractéristique humaine tandis que 'm' indique une caractéristique murine.



**Figure 24 : Influence des cellules NK dans la lutte anti-tumorale et exemple d'une voie de signalisation (d'après Wolf *et al.*, 2023).** (a) L'inhibition des cellules NK par les récepteurs inhibiteurs (KIR, NKG2A) empêche la destruction de cellules exprimant le CMH I. (b) Les cellules NK sécrètent des chimiokines qui recrutent des cellules dendritiques (DCs) de type 1 et du ligand de la tyrosine kinase 3 apparentée au Fms (FLT3L) qui activent ces DCs qui induisent à leur tour des lymphocytes T cytotoxiques tumoraux. (d) L'endommagement de la séquence d'ADN au sein des cellules tumorales mène à la production de GMP-AMP par l'enzyme cGAS qui active la protéine STING au sein de la même cellule ou qui peut être transportée aux cellules voisines où elle activera STING. Ceci mène à la production d'IFN de type I et de cytokines qui activent les cellules NK et les DCs.



### **b. Plasticité**

Il a été démontré chez l'Homme que les cellules NK infiltrant certains processus tumoraux détenaient un phénotype et des propriétés uniques et partageaient un grand nombre de similarités avec des cellules résidentes de tissu (Corvino *et al.*, 2022). Ainsi plusieurs travaux font état de cellules NK aux caractéristiques s'apparentant à celles des cellules NK décíduales, de par un phénotype CD56<sup>bright</sup>, des capacités pro-inflammatoires et cytolytiques amoindries, et la production de facteurs pro-angiogéniques. De telles cellules sont retrouvées notamment au sein de carcinomes pulmonaires à grandes cellules, de carcinomes rénaux, de mélanomes, ou encore d'adénocarcinomes mammaires (Bosi *et al.*, 2018; Bruno *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2020; Levi *et al.*, 2015) bien que les conséquences fonctionnelles de leur présence restent encore à explorer. Il est cependant suspecté une corrélation négative de ce phénotype avec le pronostic du patient en raison de l'activité pro-angiogénique de ces cellules (Corvino *et al.*, 2022).

En revanche d'autres études ont rapporté l'existence de cellules NK infiltrant les tumeurs, présentant des similitudes avec les cellules NK résidentes de tissu mais cette fois-ci avec une fonction antitumorale augmentée. Ces cellules sont qualifiées d'ieILC1-like (ie pour intraépithéliales) en raison de similarités avec ces dernières qui détiennent par ailleurs un rôle critique dans l'immunité antitumorale (Dadi *et al.*, 2016). D'autres travaux sont nécessaires à une compréhension exhaustive de cette plasticité constatée (Corvino *et al.*, 2022).

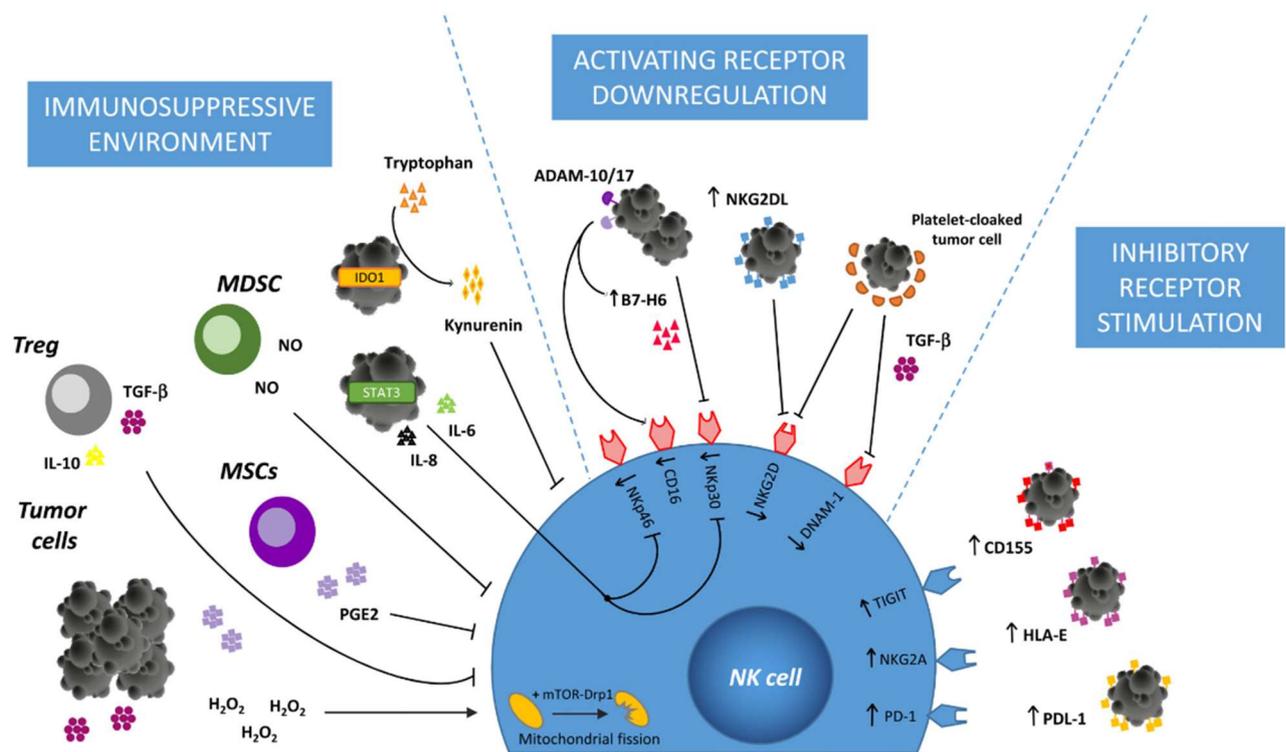
### **c. Epuisement des cellules NK**

L'épuisement immunologique a d'abord été caractérisé et décrit chez les lymphocytes T et ses principales caractéristiques sont une réduction de la cytotoxicité et de la production cytokinique, ainsi qu'une régulation à la hausse des récepteurs inhibiteurs (Bi et Tian, 2017; Wherry, 2011). Ce phénomène mime un rhéostat immunologique visant à limiter les pathologies auto-induites résultant de réponses immunologiques soutenues. Des travaux empiriques ont décrit des phénotypes chez les cellules NK s'apparentant à de l'épuisement immunologique. En effet, les cellules NK infiltrant les tumeurs présentent régulièrement dans divers travaux, une cytotoxicité ainsi qu'une production de cytokines amoindries (Corvino *et al.*, 2022). De plus il est retrouvé dans plusieurs processus tumoraux, une surexpression des récepteurs inhibiteurs (et plus spécifiquement TIM1 et PD-1) chez les cellules NK infiltrant les tumeurs (Bi et Tian, 2017). De même le récepteur inhibiteur NKG2A a été retrouvé en plus grande quantité à la surface des cellules NK infiltrantes de patients atteints de carcinome hépatocellulaire comparée à ceux de prélèvements péri-tumoraux ou du groupe contrôle sain (Corvino *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2017).

### **d. Echappement néoplasique**

Dans le cadre de tumeurs (et plus particulièrement les tumeurs dites « solides ») sont retrouvés de nombreux mécanismes de suppression de la réponse immunitaire. On peut citer, entre autres, le recrutement de lymphocytes T régulateurs, de cellules myéloïdes suppressives ou de macrophages au sein des tumeurs, l'induction de récepteurs inhibiteurs chez les lymphocytes NK et T, ou encore la production de cytokines immunosuppressives dont fait partie le TGF $\beta$ . (Kisseberth et Lee, 2021). La surproduction de TGF $\beta$  par des phénomènes néoplasiques est fréquente, et réduit l'activité des cellules NK en inhibant l'expression du NKG2D, du CD16 et la libération de cytokines ainsi que la synthèse de perforine (Kisseberth et Lee, 2021). La synthèse de ces mécanismes est retrouvée dans la Figure 25.

**Figure 25 : Mécanismes impliqués dans la dysfonction des cellules NK dans le microenvironnement tumoral humain (d'après Cózar *et al.*, 2021).** Les cellules tumorales peuvent modifier l'environnement extracellulaire en produisant des cytokines immunosuppressives telles que le TGF $\beta$ , qui réduit la fonctionnalité et l'infiltration des cellules NK. Les cellules tumorales peuvent également affecter la fonction des cellules NK en favorisant des conditions d'hypoxie, ce qui active la protéine intracellulaire mTOR-DRP1, provoquant la fragmentation mitochondriale dans la cellule NK. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les cellules tumorales produisent de la prostaglandine-E2 (PGE2), qui diminue la cytotoxicité des cellules NK. Les cellules T régulatrices (Treg) peuvent directement supprimer la fonction des cellules NK ou influencer indirectement l'inhibition des cellules NK en sécrétant de l'IL10 et du TGF $\beta$ . Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) peuvent inhiber l'ADCC des cellules NK via la sécrétion d'oxyde nitrique (NO). Les cellules tumorales sécrètent de l'IL6 et de l'IL8 qui altèrent l'activité et la fonction des cellules NK via STAT3, supprimant l'expression des récepteurs activateurs des cellules NK NKp30 et NKG2D. Dans de nombreux cancers humains, une diminution de l'expression des récepteurs activateurs NKp46, NKp30, NKG2D, DNAM1 et CD16 a été observée sur les cellules NK, ayant un impact direct négatif sur l'activation des cellules NK et leur fonction antitumorale. De plus, les cellules tumorales sont en mesure de produire et libérer les ligands de ces récepteurs activateurs (par exemple, le ligand B7-H6 de NKp30 et les ligands MICA et MICB de NKG2D), induisant une inhibition des voies de signalisation activatrices. La métalloprotéase ADAM17 exprimée à la surface des cellules tumorales, en plus de participer à la libération de B7-H6, est également capable d'induire le clivage du CD16 activateur. Les cellules tumorales peuvent attirer les plaquettes, qui à leur tour favorisent la libération de NK2GDL et de TGF $\beta$ , contribuant à la suppression de la fonction des cellules NK. Les cellules tumorales peuvent également surexprimer des ligands (par exemple, CD155, PD-L1 et HLA-E) des cellules NK.



### **e. Le modèle canin au centre de stratégies d'immunothérapie**

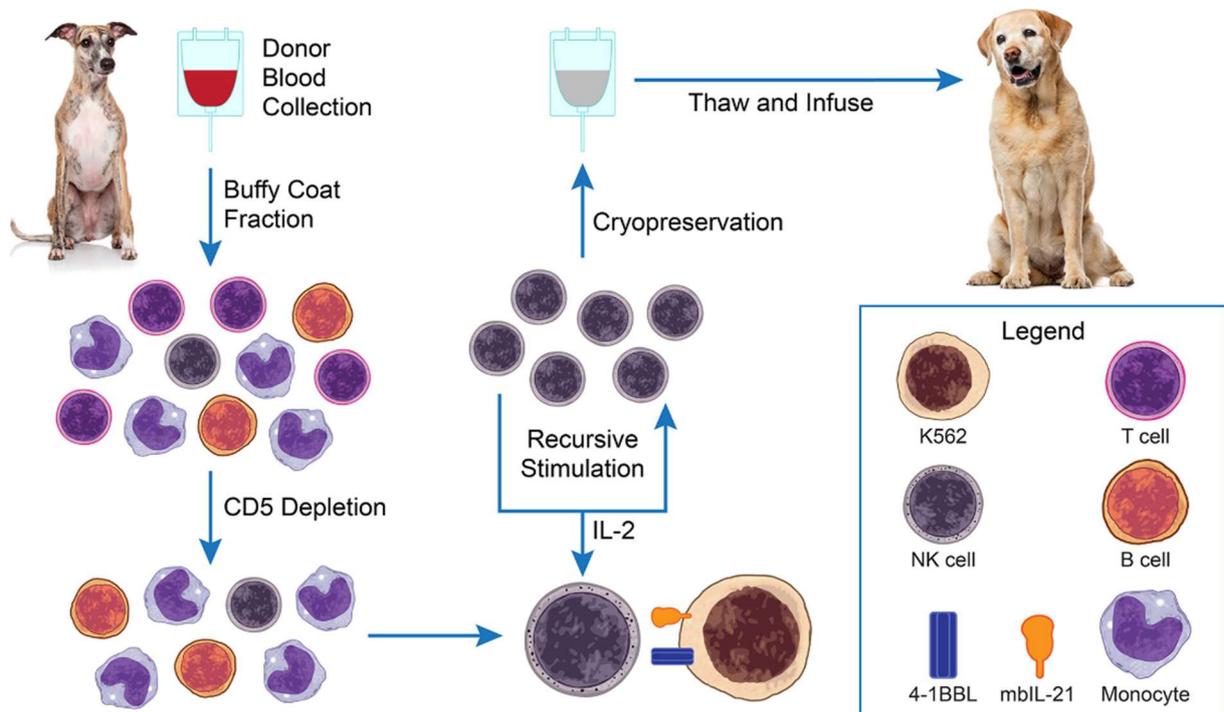
En raison de leurs propriétés énumérées ci-dessus, les cellules NK se retrouvent au centre de projets visant à utiliser leur fonction dans un but anti-tumoral. Il est possible de classer ces dernières en deux catégories : la première regroupant des stratégies d'exacerbation de l'activité anti-tumorale des cellules NK (notamment au travers d'un apport de cytokines, ou d'anticorps visant à rediriger la cytotoxicité des cellules NK contre les processus tumoraux) et la seconde regroupe des optiques de transferts de cellules NK ou de leur dérivés, qu'il s'agisse de cellules non modifiées, génétiquement modifiées de par la présence de récepteurs d'antigènes chimériques (CAR), ou encore l'emploi de vésicules extra-cellulaires dérivées des cellules NK (Hu *et al.*, 2019). Dans la partie suivante nous nous intéresserons exclusivement aux projets impliquant les chiens.

Le chien est étudié dans ce cadre en raison de sa pertinence biologique en termes d'oncologie comparative. En effet il s'agit de mammifères non consanguins développant spontanément des processus néoplasiques dans un contexte de système immunitaire inné intact. Ils démontrent également des affections communes à l'Homme avec par exemple des ostéosarcomes, des lymphomes, des gliomes ou encore des mélanomes. De fait la présentation, les mutations génétiques (telles que les translocations de Bcr-Abl, et les mutations conservées des gènes BRAF and c-kit) et les réponses thérapeutiques des processus néoplasiques canins montrent de grandes similarités avec celles de l'Homme. Enfin leur statut d'animal de compagnie leur assure un environnement commun à l'Homme et une espérance de vie augmentée propice à l'apparition de processus néoplasiques (Gingrich *et al.*, 2019 ; Gingrich *et al.*, 2021).

Au moins chez le chien, une des stratégies répond à une hypothèse dans un cadre anti-tumoral d'un déficit en cellules de l'immunité innée, du fait d'une réduction du nombre et de la fonction des cellules NK, entre autres, qui pourrait potentiellement être contré par un ajout exogène en ces dernières. Cette réduction effectrice et quantitative pourrait s'expliquer en partie par les différentes stratégies employées lors de processus néoplasiques (anesthésie, radiothérapie, chimiothérapie) ou encore la sécrétion de TGF $\beta$  par certains processus tumoraux comme les ostéosarcomes, qui peuvent avoir un effet négatif sur ces cellules (Kisseberth et Lee, 2021).

Une des tentatives d'aboutir à une amélioration de la fonction des cellules NK dans un microenvironnement tumoral hostile, consiste à conférer une résistance relative au TGF $\beta$  à ces dernières en réalisant une exposition chronique à de l'IL2 et du TGF $\beta$  lors de la phase d'accroissement des cellules (Figure 26). Il a été démontré que les cellules NK exposées à ces deux facteurs précédents, présentaient une sécrétion d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  significativement plus importantes que les cellules non exposées en l'absence et en présence de TGF $\beta$ . De plus, le premier groupe détenait une meilleure cytotoxicité et une meilleure résistance au TGF $\beta$  que le groupe témoin dans un contexte d'amputation appendiculaire et de traitement adjuvant avec de la carboplatine. En revanche, l'influence du donneur, et plus spécifiquement de la race, sur les cellules NK en fin de protocole reste à établir (Kisseberth et Lee, 2021). Par ailleurs les temps de survie ne figuraient pas dans l'étude.

**Figure 26 : Projet d'immunothérapie utilisant les cellules NK chez le chien (d'après Kisseberth et Lee, 2021).** Des PBMCs sont isolées chez le chien par une séparation sur gradient de Ficoll. Ces cellules subissent une déplétion en CD5 et sont ensuite co-cultivées et récursivement (3 fois) stimulées en présence d'IL2 (+/- TGFβ) pendant 3 semaines en compagnie de cellules nourricières K562 exprimant de l'IL21. Les cellules peuvent être ensuite utilisées directement ou congelées pour un emploi ultérieur.



Des essais combinant radiothérapie et immunothérapie ont également été entrepris chez le chien, d'abord dans un contexte de xéno greffe chez la souris, puis directement sur un modèle canin. En effet après des phases d'isolation, d'expansion puis d'activation des cellules NK canines sont injectées à des souris chez lesquelles des sarcomes canins ont été greffés. Ces derniers, et plus particulièrement les cellule souches cancéreuses, se sont révélés être sensibles à la cytotoxicité des cellules NK. Il a ensuite été démontré sur des cellules d'ostéosarcome canin *in vitro* et *in vivo* sur le modèle murin précédemment cité, que les radiations augmentaient la cytotoxicité des cellules NK canines dans le premier cas, tandis qu'elles augmentaient le recrutement de cellules NK intra-tumorales dans le second. Ces observations ont mené les auteurs à réaliser un essai *in vivo* chez des chiens atteints d'ostéosarcomes locaux sans métastases. Une radiothérapie palliative et des injections de cellules NK ont ensuite été réalisées. Les chiens de l'étude présentaient par la suite une survie du paramètre « sans progression » améliorée et une diminution de l'incidence de métastases (avec une influence quantitative du nombre de cellules injectées) par rapport aux témoins historiques (Canter *et al.*, 2017).

Une autre équipe (Lee *et al.*, 2021) a quant à elle démontré l'influence d'exosomes de cellules NK canines activées chez des souris chez lesquelles ont été induit un carcinome mammaire canin. Un poids tumoral plus faible a été constaté chez le groupe traité avec les exosomes comparé au groupe témoin, démontrant alors un rôle antitumoral de ces derniers. On retrouvait également dans le groupe traité une réduction significative de Bmi-1 (une protéine impliquée dans le renouvellement des cellules souches mammaires), MMP-3 (une protéine impliquée dans la formation tumorale murine), d'IL1β, d'IL6, de TNFα (des cytokines pro-inflammatoires), de Bax (une

protéine impliquée dans l'apoptose mitochondriale), et de Bcl-xL (une protéine pro-survie et anti-apoptotique), ainsi que du CD133 (une protéine transmembranaire impliquée dans la tumorigénèse). Ont également été retrouvées une expression réduite de PCNA et une discrète augmentation de l'expression de la protéine p53. Les auteurs ont alors suggéré que ces exosomes exercent leur effet anti-tumoral en régulant à la baisse les marqueurs associés aux cellules souches cancéreuses et en augmentant le rôle suppresseur tumoral de la protéine p53 dans ce modèle.

#### **f. Néoplasies des cellules NK**

- *Chez l'Homme*

Les processus néoplasiques des cellules NK ont été réorganisés chez l'Homme en 2022 à l'occasion de la 5<sup>ème</sup> édition de la classification des néoplasies hémato-lymphoïdes par l'OMS sur la base d'une actualisation des connaissances sur ces entités aux caractéristiques souvent troubles en raison de leur rareté. Ainsi, nous distinguerons dans cette partie la leucémie agressive à cellules NK, la leucémie à grands lymphocytes NK granuleux, le lymphome extranodal à cellules NK/T (cellules NK et lymphocytes T ; à différencier des cellules NKT qui sont une seule population cellulaire), le lymphome nodal à cellules NK/T des individus positifs au virus d'Epstein-Barr (EBV) et enfin les troubles lymphoprolifératifs indolents du tractus digestif (Alaggio *et al.*, 2022).

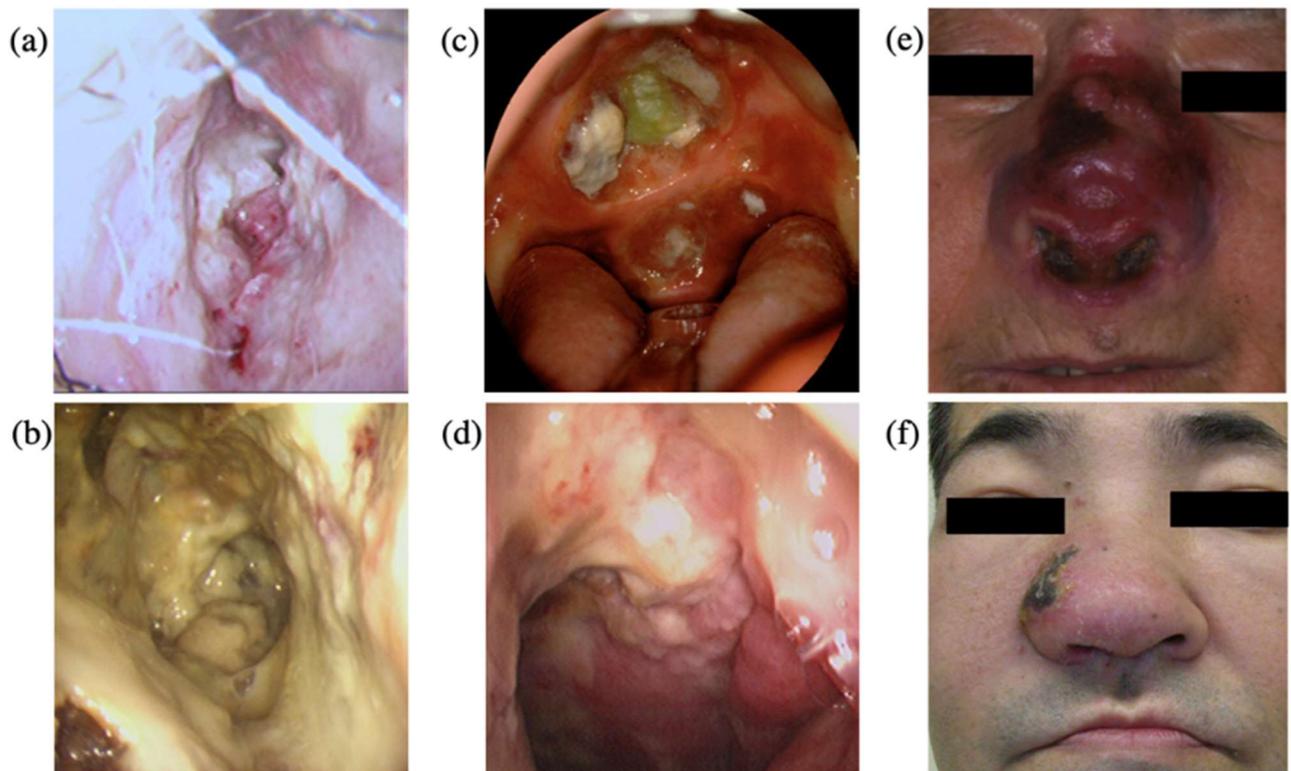
- Le lymphome extranodal à cellules NK/T/ Extranodal (NK/T-cell lymphoma)

Le lymphome extra nodal à cellules NK (ENKTCL) est un processus néoplasique confondu dans le terme « lymphome extranodal à cellules NK/T » en raison des deux lignées cellulaires qu'il intéresse, majoritairement focal et qui intéresse préférentiellement la face, bien que de rares cas décrivent une insuffisance hépatique et médullaire secondaires à une infiltration tumorale. Cette forme est rare chez l'Homme, touche préférentiellement les hommes d'âge moyen et possède un tropisme asiatique (3-10% des lymphocytes non Hodgkiniens contre moins de 1 % en occident) (Valli, 2007). Bien que le détail génétique derrière cette néoplasie reste encore à élucider, il est suspecté une influence de causes génétiques, infectieuses (EBV) ou encore environnementales (exposition à des pesticides)(Harabuchi *et al.*, 2019). Les tissus environnants tels que les sinus paranasaux, les orbites et la peau de la face sont fréquemment infiltrés (lui valant son qualificatif de « nasal-type »)(Alaggio *et al.*, 2022)(Figure 27) et parfois les nœuds lymphatiques et d'autres tissus à distance tels que le foie, les poumons, le tractus digestif et la moelle osseuse. On peut également retrouver une ulcération ainsi qu'un granulome nécrotique progressifs des cavités nasales, du palais et de l'oropharynx. Ainsi, une obstruction nasale, de l'épistaxis, un gonflement de la face, des douleurs au niveau de la gorge et un enrouement sont des symptômes classiquement retrouvés dans le cadre de l'ENKTCL. On retrouve également des signes systémiques aspécifiques tels qu'une fièvre persistante et une perte de poids (Harabuchi *et al.*, 1996 ; Harabuchi *et al.*, 2019). Des métastases cutanées, entériques et testiculaires sont décrites (Valli, 2007).

L'affection se caractérise par une large variabilité phénotypique et une nécrose extensive, rendant son diagnostic anatomo-pathologique parfois complexe (Valli, 2007). On retrouve à l'échelle tissulaire des infiltrations diffuses de cellules lymphomateuses pléomorphes accompagnées de

cellules inflammatoires dans un contexte de nécrose. Bien qu'encore trouble, un rôle de l'EBV dans la lymphomatogénèse est établi et il est suspecté une implication de ce virus dans la capacité à échapper au système immunitaire (Harabuchi *et al.*, 1996 ; Harabuchi *et al.*, 2019). Des cytokines, chimiokines et mIR possiblement en lien voire produits par les protéines ontegéniques de l'EBV sont des acteurs majeurs de la progression tumorale dans le cadre de l'ENKTL (Harabuchi *et al.*, 2019)

**Figure 27 : Lésions retrouvées lors de lymphome extranodal à cellules NK/T de type nasal (Harabuchi *et al.*, 2019).** (a) Granulomes au sein de la cavité nasale ; (b) Tissu nécrotique au sein de la cavité nasale ; (c) Ulcération du palais dur ; (d) Granulome nécrotique dans le nasopharynx ; (e,f) Infiltration de la peau.



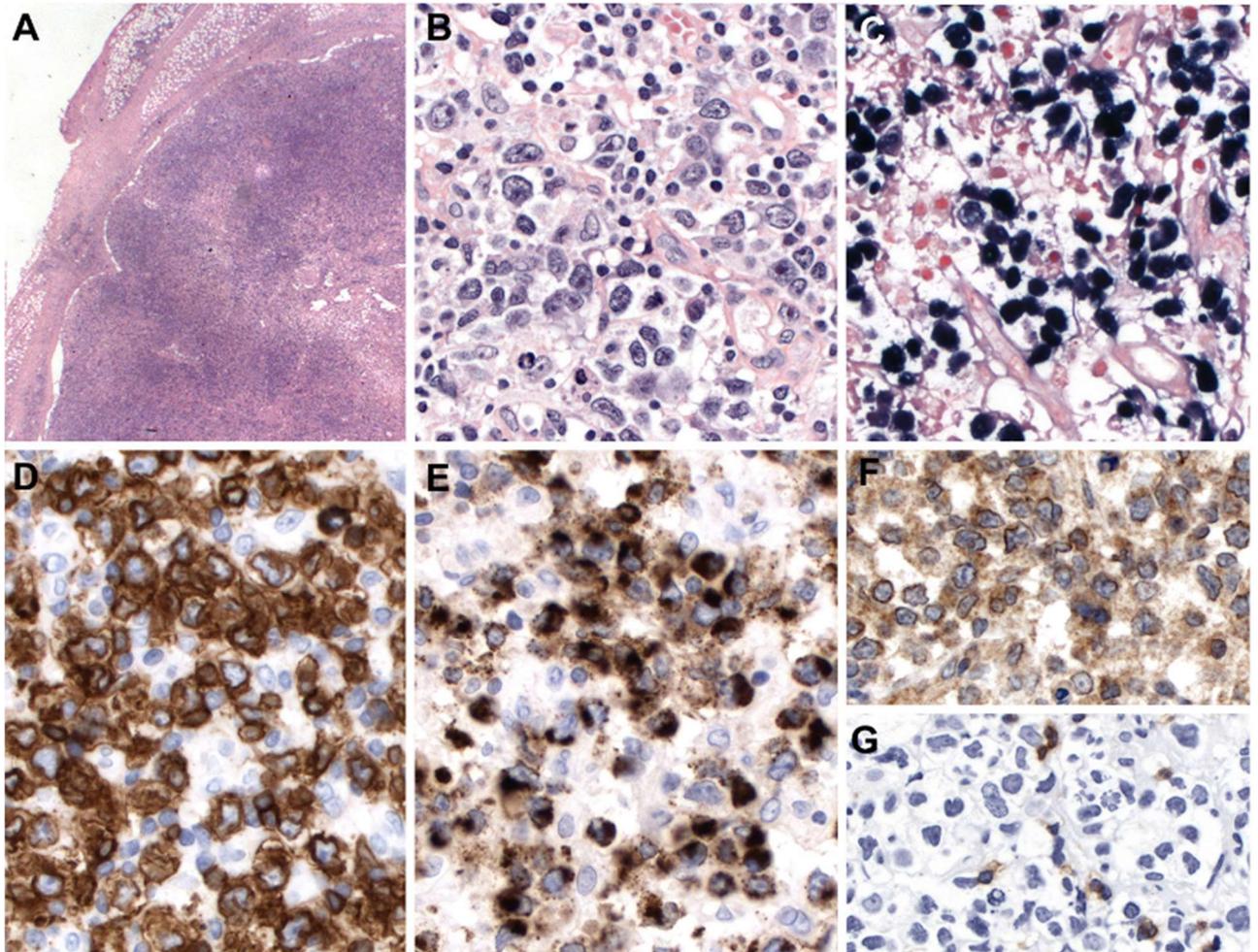
Le diagnostic repose sur la mise en évidence par immunohistochimie de cellules infiltrantes exprimant l'EBER1 ou le CD56 (Harabuchi *et al.*, 2019), bien qu'il ait été également rapporté l'expression variable de CD3, CD4, CD5, CD7, CD30, CD45, ou de TIA-1 (Pongpruttipan *et al.*, 2011). D'autres méthodes, telles que la mise en évidence d'ADN viral sérique de l'EBV ou encore de microARN ou d'un taux élevé de PD-L1 sérique peuvent constituer une aide au diagnostic (Harabuchi *et al.*, 2019). Le volet thérapeutique repose sur une chimiothérapie basée sur la L-asparaginase en association avec une radiothérapie (Alaggio *et al.*, 2022) avec une médiane de suivi de 32 mois et une survie à 2 ans de 78% (Harabuchi *et al.*, 2019).

- Le lymphome nodal à cellules NK/T des individus positifs à l'EBV/EBV+ nodal T- and NK-cell lymphoma

Il s'agit d'un lymphome rare lié à une infection par l'EBV intéressant principalement les nœuds lymphatiques sans implication nasale et une rare implication extra-nodale. Il affecte des individus globalement plus âgés que pour l'ENKTL avec une prédilection masculine (Kim *et al.*, 2019). Les

patients présentent généralement une lymphadénomégalie et des troubles systémiques aspécifiques. La cinétique est agressive, ainsi son pronostic est sombre et sa médiane de survie inférieure à 4 mois (Jeon *et al.*, 2015; Quintanilla-Martinez *et al.*, 2023). Concernant l'aspect morphologique, on retrouve des proliférations de larges cellules atypiques à caractéristiques centroblastiques ou encore une prolifération diffuse de cellules pléomorphes occasionnellement associée à de la nécrose et encore plus rarement à des lésions d'angiodestruction. La majorité des cas rapportés fait état d'un immunophénotype les rattachant aux lymphocytes T (Figure 28), en effet les cas présentant un phénotype de cellules NK ne sont retrouvés que dans 6 à 15% des cas (Kim *et al.*, 2019). De fait on retrouve dans la plupart des cas, en plus de la détection de l'EBV, des arrangements clonaux du TCR, une surrégulation de la voie PD-L1, des marqueurs CD2 et CD8 et une sous-expression du CD56 comparé aux troubles lymphoprolifératifs indolents du tractus digestif (*cf infra*) (Kim *et al.*, 2019).

**Figure 28 : Histologie d'un nœud lymphatique d'un patient atteint de lymphome nodal à cellules NK/T positif à l'EBV (d'après Kim *et al.*, 2019).** (A) Nœud lymphatique avec un effacement complet de son architecture par un infiltrat diffus s'étendant au-delà de la capsule et infiltrant le tissu adipeux péri-nodal (hémalum et éosine (HE), grossissement 12,5x). (B) Les cellules néoplasiques sont de grande taille, pléomorphes, dotées d'un noyau irrégulier et d'un cytoplasme pâle ou clair (HE, 400x). (C–E) Cellules néoplasiques positives pour EBER, CD56, TIA-1 (hybridation in situ et immunohistochimie, 400x). (F) Un immunomarquage du TCR-gamma met en évidence la déviance gamma-delta des cellules tumorales (immunohistochimie, 400x). (G) Le TCR alpha-beta (BetaF1) est absent des cellules tumorales mais présent chez les lymphocytes T réactifs (immunohistochimie, 400x).



- Leucémie à grands lymphocytes NK granuleux/ NK-large granular lymphocytic leukaemia

La leucémie à grands lymphocytes granuleux (NK-LGLL : NK-large granular lymphocytic leukaemia) est un trouble rare constituant entre 2 et 5% des troubles lymphoprolifératifs chroniques en Occident (Moignet et Lamy, 2018), semblant affecter préférentiellement les individus âgés sans prédisposition sexuelle (Moignet et Lamy, 2018; Rahul et al., 2022). Il est établi qu'elle représente 10% des cas des troubles lymphoprolifératifs chroniques de LGL (Moignet et Lamy, 2018).

Anciennement qualifiée de « troubles lymphoprolifératifs chroniques des cellules NK » dans la 4<sup>e</sup> classification, la découverte récente d'expansion clonale ou oligoclonale dans cette affection a

motivé une modification d'appellation en raison de points communs avec la leucémie à grands lymphocytes T granuleux (Alaggio *et al.*, 2022). Il est à noter que la littérature traite souvent des deux affections communément. L'origine précise de la prolifération clonale est encore inconnue à ce jour, en dépit de la mise en évidence de voies moléculaires impliquées dans la pathogénie de l'affection (Rahul *et al.*, 2022). Il a également été démontré un rôle important de l'IL 15 et du PDGF dans l'activation et la prolifération incontrôlée des LGL (Lodolce *et al.*, 2002; Rahul *et al.*, 2022).

L'aspect clinique est dominé par de l'abatement dans la moitié des cas (Rahul *et al.*, 2022), et des cytopénies sont également décrites, bien qu'un tiers des patients soit asymptomatique au moment du diagnostic (Moignet et Lamy, 2018). La présentation initiale est souvent caractérisée par des infections chroniques relatives à une neutropénie induite. En effet on note une neutropénie dans la moitié des cas et une thrombocytopénie dans moins de 20% des cas ainsi que des anémies et des infiltrations lymphocytaires de la moelle osseuse (Sokol et Loughran, 2006). On retrouve parfois une splénomégalie, et encore plus rarement une hépatomégalie ou une lymphadénopathie (Moignet et Lamy, 2018; Pflug *et al.*, 2022). Cette néoplasie est associée à la présence de maladies auto-immunes dans 15 à 40% des cas, dont notamment l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique ou encore le syndrome de Sjögren. L'électrophorèse des protéines sériques met en évidence une hypogammaglobulinémie polyclonale (Moignet et Lamy, 2018).

D'un point de vue phénotypique la NK-LGLL se caractérise principalement par des cellules CD3-/CD8+/CD16+/CD56+/CD57<sup>+/-</sup> (Lamy *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2004) et plus précisément par le phénotype CD2+/sCD3-/CD3ε+/TCRαβ-/CD4-/CD8+/CD16+/CD56+/CD57<sup>+/-</sup> (Lima *et al.*, 2004; Moignet et Lamy, 2018). Il a longtemps été difficile d'établir la clonalité de la NK-LGLL puisque ses cellules n'expriment pas de TCR (Moignet et Lamy, 2018). Néanmoins plusieurs éléments permettent de contourner cette problématique, tels que la présence d'une expression du KIR restreint (à savoir une faible expression d'au moins 2 types de récepteurs KIR) ou encore la mise en évidence de mutations somatiques des gènes *STAT3*, *STAT5b*, *TET2* ou *TNFAIP3* (Drillet *et al.*, 2022).

Cette affection est associée à une cinétique indolente (Pflug *et al.*, 2022). De fait une majorité de patients ne nécessite pas de traitement particulier au moment du diagnostic, en dehors d'une surveillance et de contrôles réguliers. Cependant l'évolution est progressive et de nombreux patients nécessitent par la suite d'être traités au moment où ils deviennent symptomatiques (Rahul *et al.*, 2022).

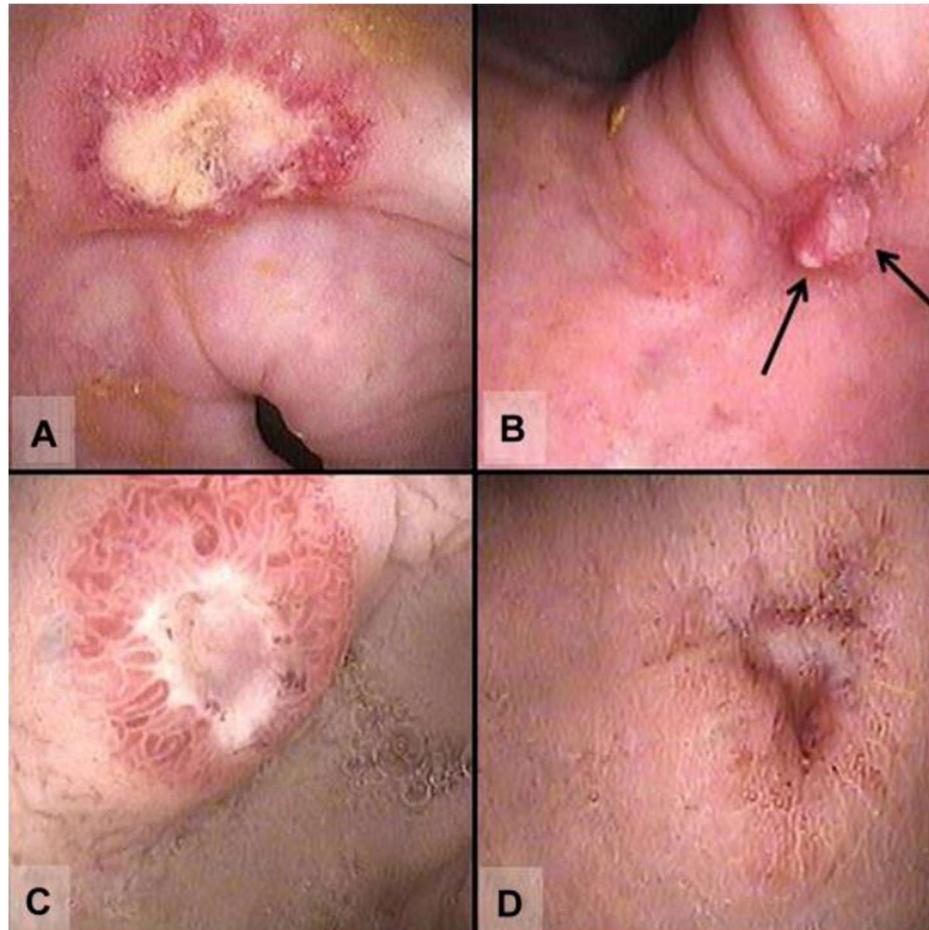
#### □ Troubles lymphoprolifératifs indolents du tractus digestif

Anciennement distingués sous les noms de gastropathie lymphomatoïde ou d'entéropathie à cellules NK, les troubles lymphoprolifératifs indolents du tractus digestif, aussi qualifiés d'iNKLPD (Indolent NK-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract) ont longtemps été supposés émaner de processus réactionnels. Leur caractère néoplasique est établi à ce jour (Alaggio *et al.*, 2022).

Les iNKLPD correspondent à un désordre lymphoprolifératif atypique de découverte récente et d'étiologie inconnue. Les patients atteints présentent fréquemment des signes digestifs troubles et certaines équipes ont identifié la présence d'hémorragies muqueuses, d'ulcères superficiels et/ou de polypes touchant plusieurs organes du tractus digestif tels que l'estomac, l'intestin grêle, le côlon

ou plus rarement la vésicule biliaire (Jaffe, 2020; Koo *et al.*, 2021; Xia *et al.*, 2019) avec des lésions infra-centimétriques dans la plupart des cas (Figure 29)(Koo *et al.*, 2021).

**Figure 29 : Images endoscopiques d'iNKLPD (Mansoor *et al.*, 2011).** (A-B) Lésions coliques. Ces lésions coliques prennent généralement la forme d'ulcères entourés d'érythème et d'œdème (A), bien que certaines lésions prennent un aspect plus nodulaire ou polypoïde (B). (C-D) Lésions gastriques et duodénales.



Les lésions peuvent persister, régresser ou apparaître sur d'autres sites du tractus digestif (Xia *et al.*, 2019). La faculté de ces deux affections à mimer des lymphomes à cellules T et NK agressifs peut conduire à une erreur de diagnostic et donc à une thérapie inappropriée (Xia *et al.*, 2019).

En dépit d'une origine inconnue et de l'aspect prolongé mais indolent de l'affection chez les patients atteints, un caractère bénin leur a été attribué à leur découverte bien que des tests de clonalité n'aient pu être réalisés (Mansoor *et al.*, 2011). En effet tous les cas rapportés suivent une cinétique indolente, avec à ce jour, aucune mortalité associée rapportée (Wang *et al.*, 2019).

Le profil immunohistochimique des iNKLPD est caractéristique : les cellules expriment le CD56 et des marqueurs cytotoxiques (TIA-1 et/ou le granzyme B) avec une expression variable de marqueurs des lymphocytes T (positifs pour CD7 et le CD3 cytoplasmique, et négatifs CD5, CD4, CD8, CD10, CD20, CD30, and TCR $\beta$ F1)(Wang *et al.*, 2019). D'autres travaux rapportent une positivité pour le CD43, le CD45 et le CD56. Par ailleurs le test de clonalité des lymphocytes T est

utilisé comme examen d'exclusion (Xia *et al.*, 2019). Des mutations de JAK3 ont également été rapportées dans cette affection (Jaffe, 2020).

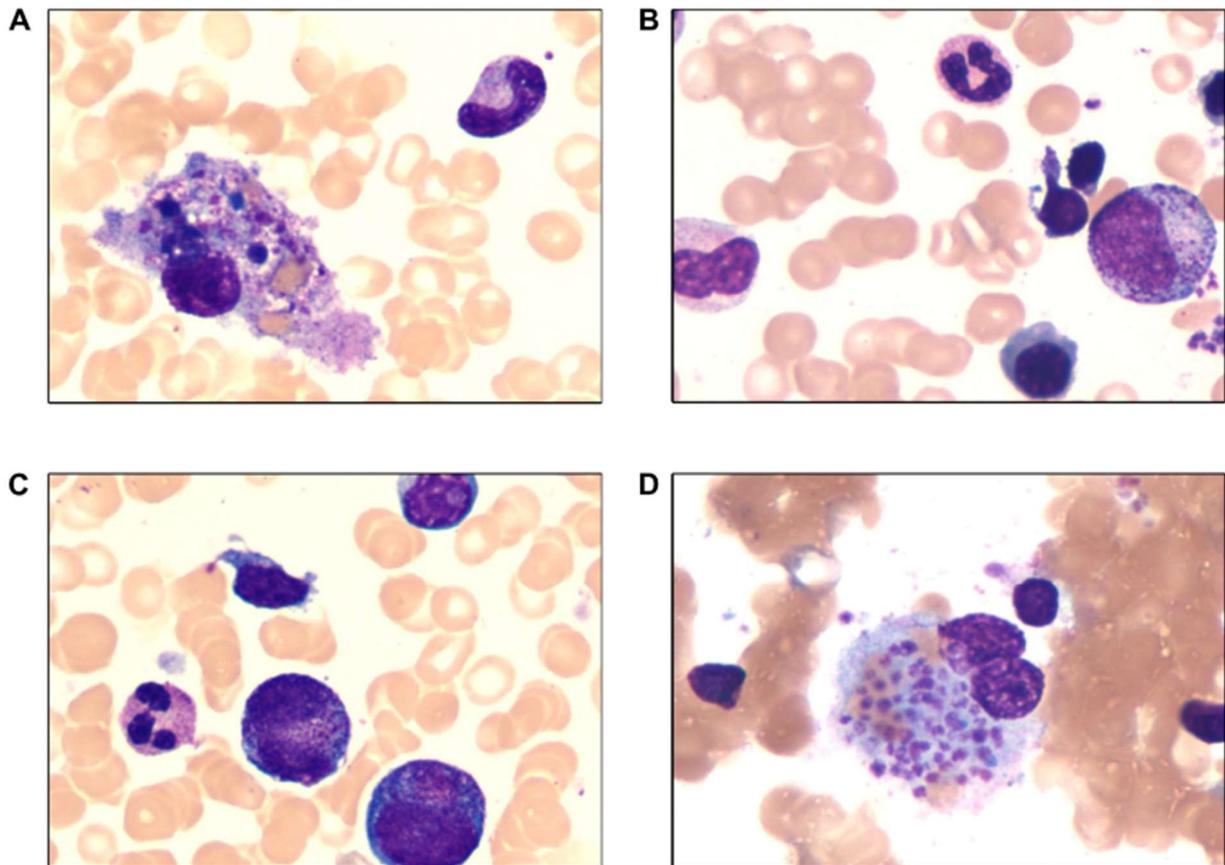
Par ailleurs il a été noté la présence d'*Helicobacter pylori* chez la majorité des individus nippons présentant un iNKLPD (à l'époque gastropathie lymphomatoïde). La régression et l'absence de récurrence des lésions ulcérales de l'estomac et de l'intestin lors de la prise en charge d'un patient infecté par cette bactérie lors du diagnostic et ayant subi une antibiothérapie ciblée suggère un lien entre l'infection par l'agent pathogène et l'entité décrite (Nakajima *et al.*, 2022). En revanche tous les cas rapportés de ces affections étaient négatifs pour le virus d'Epstein-Barr (Xia *et al.*, 2019).

#### □ Leucémie agressive à cellules NK

Il s'agit d'une affection rare chez l'Homme où elle est principalement retrouvée au Moyen-Orient et en Asie et fréquemment associée à une infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) (Lima, 2013; Valli, 2007). L'étiologie précise reste peu comprise en raison de sa rareté, bien que l'EBV semble constituer un des facteurs responsables de sa nature agressive et jouer un rôle dans la pathogénèse de l'affection (Kimura et Fujiwara, 2019; Takahashi *et al.*, 2011).

Elle touche préférentiellement l'individu adulte sans préférence de sexe. Les principaux sites impliqués sont la moelle osseuse, le sang périphérique, le foie et la rate (Ishida, 2018). L'aspect clinique et paraclinique est dominé par la présence de fièvre, de figures d'hémophagocytose lors de frottis de la moelle osseuse, d'insuffisance hépatique et de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (Ishida, 2018 ; Yang *et al.*, 2022). En l'absence de critère diagnostique standardisé ce dernier repose sur l'épidémiologie, la reconnaissance des sites impliqués et des éléments cliniques mais surtout sur l'identification de cellules leucémiques aberrantes d'un point de vue immunophénotypique et morphologique (Ishida *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). Les cellules tumorales ressemblent à de grands lymphocytes granuleux mais affichent parfois un pléomorphisme (Figure 30). Ces cellules affichent un immunophénotype CD2+, CD3- en surface, CD7+, CD3ε+, CD16+ et CD56+ avec une absence de TCR et une absence de marqueurs caractéristiques des cellules myéloïdes et des lymphocytes B (Ishida, 2018; Yang *et al.*, 2022). Malgré l'agressivité clinique et l'issue très souvent létale avec une médiane de survie d'environ 2 mois (Lima, 2013; Tang *et al.*, 2017), il n'existe pas d'option thérapeutique de choix pour l'ANKL (Nazarullah *et al.*, 2016). En effet la production de glycoprotéines P (une molécule de transport à fonction notamment de barrière biologique en expulsant certaines toxines et xénobiotiques des cellules (Lin et Yamazaki, 2003)) par les cellules NK néoplasiques, mène à une faible réponse des patients à l'administration de diverses molécules telles que le cyclophosphamide, la doxorubicine, la vincristine et la prednisolone (Egashira *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2022). De par la capacité de la L-asparaginase à induire l'apoptose de cellules NK tumorales (Ando *et al.*, 2005), cette molécule est à la base de plusieurs protocoles de chimiothérapie tels que SMILE (dexaméthasone, méthotrexate, ifosfamide, L-asparaginase, and etoposide), AspaMetDex (L-asparaginase, méthotrexate, and dexaméthasone) et VIDL (etoposide, ifosfamide, dexaméthasone, and L-asparaginase). En revanche on observe moins de 20% de rémission avec ces traitements et une greffe de cellules souches hématopoïétiques est nécessaire pour améliorer les chances de rémission (Ishida *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2016).

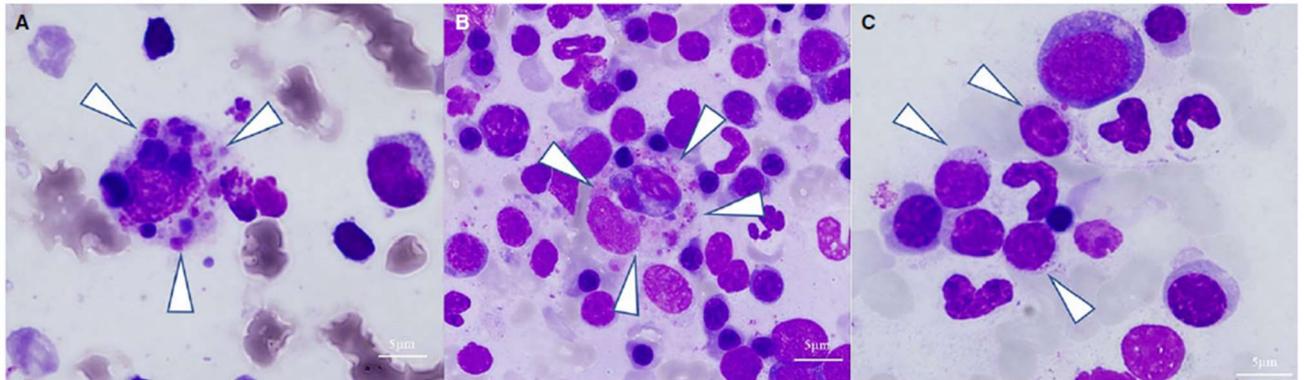
**Figure 30 : Coloration Wright-Giemsa d'un frottis de moelle osseuse d'un patient atteint de leucémie agressive à cellule NK ( $\times 1,000$ ) (d'après Yang *et al.*, 2022). (A) Figure d'hémophagocytose. (B–D) Large lymphocytes granuleux.**



- *Chez le chien – Leucémie et lymphome à grands lymphocytes granuleux*

Si les leucémies et lymphomes à grands lymphocytes granuleux (LGLL) sont décrits chez le chien (ADACHI *et al.*, 2022; Kotb *et al.*, 2021) il est à noter un manque de littérature spécifique concernant les processus néoplasiques des cellules NK. De plus les processus néoplasiques provenant des cellules NK sont considérés comme minoritaires parmi les LGLL (Bonkobara *et al.*, 2007; Jaensch *et al.*, 2022) et sont souvent diagnostiqués sur la base d'une absence d'expression de CD3 et de TCR (Bonkobara *et al.*, 2007; Snead, 2007). Il s'agit d'une affection rare, à différencier d'une lymphocytose réactionnelle (Snead, 2007) parfois secondaire à une infection par *Ehrlichia canis* (Heeb *et al.*, 2003) et intéressant usuellement les chiens d'âge moyen à âgé. L'aspect clinique est trouble avec des symptômes vagues voire absents et la cytologie montre, la plupart du temps, de grands lymphocytes non blastiques avec un cytoplasme abondant contenant fréquemment des granules azurophiles (Bonkobara *et al.*, 2007; Elliott et Villiers, 2018) (Figure 31).

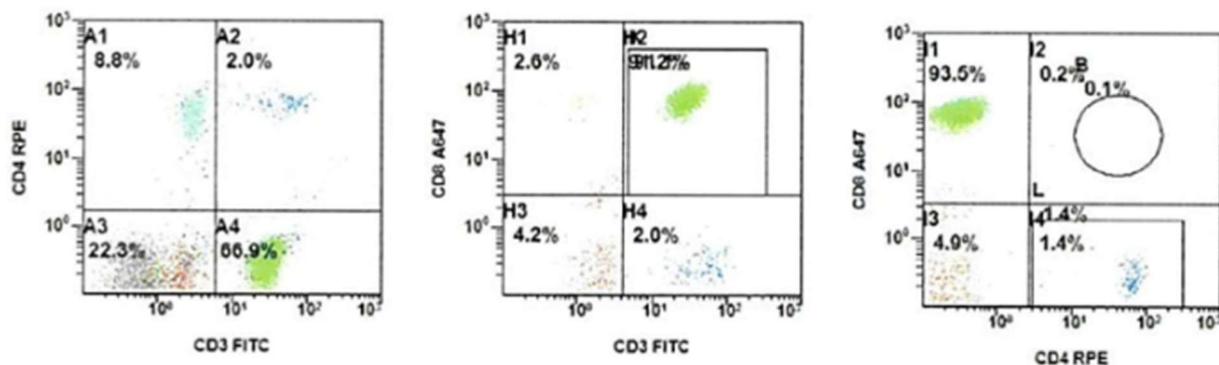
**Figure 31 : Microphotographies de frottis de moelle osseuse chez un chien atteint de LGLL (coloration de Wright-Giemsa) (d'après Akiyoshi *et al.*, 2019). (A, B) Les flèches indiquent des phagocytoses par les macrophages. (C) Les flèches indiquent des lymphocytes matures dotées d'un nombre variable de granules azurophiles.**



Une lymphocytose variable est retrouvée allant jusqu'à 90% des lymphocytes circulants (Jaensch *et al.*, 2022), ainsi qu'une cytopénie modérée à absente, ou encore une neutrophilie (Elliott et Villiers, 2018; Jaensch *et al.*, 2022). L'analyse d'articles précédents fait état d'une anémie dans 56 % des cas, une thrombocytopénie dans 25% des cas, une neutropénie dans 17% des cas. Une neutrophilie est également rapportée dans 49% des cas (Jaensch *et al.*, 2022). Un syndrome hémophagocytaire est occasionnellement rapporté (Akiyoshi *et al.*, 2019). Sur le plan biochimique une étude met en évidence une augmentation des GGT associée à des valeurs usuelles pour le reste des marqueurs hépatiques. L'étiologie de ce phénomène reste à ce jour inconnue (Jaensch *et al.*, 2022).

D'un point de vue phénotypique il apparaît que la combinaison la plus courante est celle de lymphocytes T CD3+/CD4-/CD8+, bien que de rares cas aient été reportés avec un phénotype atypique CD3+/CD4+/CD8+ ou encore CD3+/CD4-/CD8- (Jaensch *et al.*, 2022).

**Figure 32 : Résultats typiques en cytométrie de flux de chiens avec un(e) LGLL (d'après Jaensch et al., 2022).** Dans ce cas précis l'entité se caractérisait par les marqueurs CD3+CD4-CD8+.



On retrouve concernant cette affection un pronostic variable. Ainsi, une étude comptant 9 chiens fait état de survies variant entre 5 et 54 mois (Jaensch *et al.*, 2022). Concernant le volet thérapeutique des protocoles CHOP, combinant de la lomustine, de la vincristine et de la procarbazine ou combinant de la prednisolone, de la lomustine et de la cytarabine, ou encore de la lomustine et de la cyclosporine A ont été décrits dans ces affections (Adachi *et al.*, 2022). La réponse au traitement montre une grande variabilité selon la localisation anatomique, le protocole thérapeutique et les études publiées (entre 6 et 508 jours ; résultats comprenant majoritairement des essais sur des lymphomes à cellules T) (Adachi *et al.*, 2022).

Ainsi il transparait un manque de données globales concernant les cellules NK canines, et ces connaissances, lorsqu'elles sont présentes, sont principalement orientées vers des essais thérapeutiques. De fait on note une faible quantité d'études sur la cellule NK canine en conditions physiologiques et il en découle une opacité concernant leur nombre chez le chien sain corrélée à une absence d'outils spécifiques d'identification, bien qu'actuellement certains sont en cours de développement et/ou de commercialisation. La mise au point de combinaisons d'éléments de caractérisation sensibles et spécifiques représente un enjeu majeur dans l'identification de lymphomes et leucémies atypiques des cellules NK, et le Biopôle Alfort détient certains anticorps capables de se lier à des marqueurs spécifiques des lymphocytes canins. Ainsi, la seconde partie de ce manuscrit sera consacrée à la mise au point de ces nouveaux marquages avec ces anticorps disponibles, voire d'une combinaison des anticorps, afin d'identifier les cellules NK canines dans la population lymphocytaire circulante, par cytométrie de flux au Biopôle Alfort.

# Deuxième partie : étude expérimentale

---

## 1. Introduction

Cette thèse est inspirée par un chien dont un échantillon sanguin a été présenté au Biopôle Alfort en vue d'un immunophénotypage sur la base d'une suspicion de lymphome/leucémie. L'immunophénotypage par cytométrie de flux des lymphocytes présents dans le sang, a montré un phénotype CD3<sup>-</sup> et CD21<sup>-</sup> pour la population lymphocytaire majoritaire. Ainsi, l'identification des cellules circulantes parmi les PBMCs de caractéristiques lymphocytaires en taille et granulosité étant ressortie non concluante, une suspicion de lymphome à cellules NK a été établie. Les anticorps permettant une caractérisation de marqueurs spécifiques des cellules NK canines n'étant pas disponibles au moment de débiter cette thèse, ni à l'heure actuelle, un essai d'identification de ces cellules à l'aide d'anticorps spécifiques des marqueurs CD3, CD8 et CD11b, a été entrepris suivant la littérature citée dans la première partie de ce manuscrit qui suggère que ces marqueurs peuvent permettre de discriminer les différentes populations lymphocytaires et d'identifier les cellules NK qui seraient de phénotype CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> et CD11b<sup>+</sup>. Ainsi, il a été décidé dans un premier temps de tester cette combinaison de marqueurs à la fois sur les cellules restantes de ce chien particulier, et également à partir de PBMCs isolées et conservées à -80°C au BioPôle Alfort, surnuméraires, issues d'autres projets de recherche clinique (ayant eu une autorisation du Comité de Recherche Clinique de l'EnvA), et issues de « déchets biologiques » provenant de chiens du service des Urgences et Soins Intensifs (URSI) du Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire des Animaux de Compagnie (CHUV-AC). Dans un second temps, d'autres marqueurs cités dans la littérature ont été testés pour affiner ce phénotypage, tels que CD5 et NKp46 (Gingrich *et al.*, 2019 ; Gingrich *et al.*, 2021).

Le but de ce travail est *in fine* de pouvoir offrir un immunophénotypage supplémentaire pour identifier potentiellement des lymphomes ou des leucémies qui seraient négatifs pour les marqueurs classiques des lymphocytes T et B, respectivement CD3 et CD21.

## 2. Matériels et méthodes

### A. Matériel

#### a. Cellules mononucléées du sang périphérique canin (PBMCs)

Les PBMCs utilisées dans ce projet provenaient :

- du chien à l'origine de cette thèse, avec une suspicion de leucémie, immunophénotypé au BioPôle pour CD3 et CD21 initialement (n=1, cellules fraîches, c'est-à-dire non congelées avant l'immunophénotypage)
- de chiens admis au service des urgences et soins intensifs du CHUV-AC, dont le sang avait été prélevé à des fins diagnostiques. Le reste de sang non utilisé, considéré comme « déchet biologique » avait été récupéré pour cette étude. (n=7, cellules fraîches et congelées). Les

consentements des propriétaires sont disponibles sur demande auprès de l'auteur ou de la directrice de cette thèse.

- du chien dit « IZ », dont le sang avait été envoyé au BioPôle par une clinique extérieure pour immunophénotypage CD3/CD21 sur sang total (n=1, cellules fraîches / « déchet biologique »)

- de PBMCs isolées et conservées à -80°C au BioPôle Alfort, surnuméraires, issues d'autres projets de recherche clinique (n=31)

Le traitement de ces échantillons pour l'obtention des PBMCs et leur marquage est décrit ci-après.

### ***b. Anticorps***

Le Tableau 3 résume les caractéristiques des différents anticorps utilisés dans cette étude :

**Tableau 3 : Résumé des caractéristiques des principaux anticorps utilisés.**

Type	Spécificité d'espèce (espèce source)	Fluorochrome associé	Fournisseur	Validé chez le chien	Dilution
Anti-CD3	<i>Anti-chien (souris)</i>	FITC	BioRad Antibodies	Utilisé couramment en routine	1/20 <sup>ème</sup>
Anti-CD5	<i>Anti-humain (souris)</i>	PE	Miltenyi	<i>Jamais testé</i>	1/50 <sup>ème</sup>
Anti-CD8	<i>Anti-chien (rat)</i>	A647	BioRad Antibodies	Utilisé couramment en routine	1/20 <sup>ème</sup>
Anti-CD11b	<i>Anti-humain (souris)</i>	PE	Miltenyi	Utilisé couramment en routine	1/50 <sup>ème</sup>
Anti-Nkp46	<i>Anti-humain (souris)</i>	PE	Miltenyi	<i>Jamais testé</i>	1/50 <sup>ème</sup>

Trois combinaisons ont été réalisées : anti-CD3/anti-CD5/anti-CD8 (mix 1), anti-CD3/anti-CD11b/anti-CD8 (mix 2) ainsi qu'anti-CD3/anti-CD8/anti-NKp46 (mix 3).

### ***c. Cytomètre de flux***

Le cytomètre employé était un cytomètre BD Accuri™ C6 Plus à jour de ses révisions, et le traitement des données a été réalisé avec le logiciel associé (BD CSampler™ Plus). L'ensemble du matériel consommable a été fourni par le Biopôle Alfort.

## **B. Protocole**

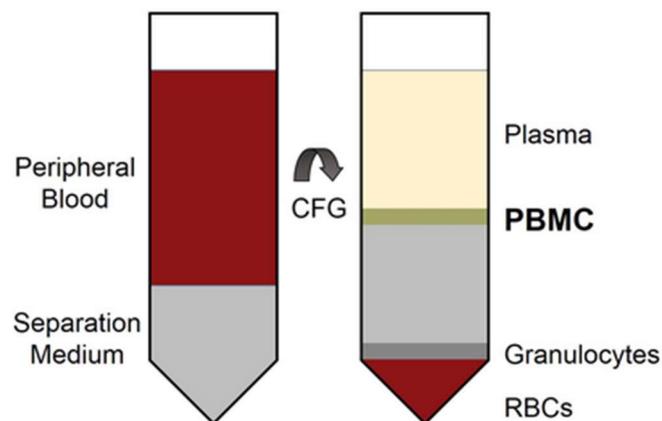
### ***a. Isolement des PBMCs à partir du sang total et protocole de marquage***

- ***Isolement des PBMCs***

Le sang récemment prélevé sur tube EDTA était dilué avec 2 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) puis déposé délicatement sur 3 mL de Ficoll (polysaccharide hydrophile neutre) préalablement présent dans le tube de centrifugation de 15 mL. Le tube était ensuite centrifugé à

2000 rotations par minute (rpm) pendant 20 minutes sans frein. L'anneau de PBMCs était alors prélevé à l'aide d'une pipette pasteurelle (Figure 33) puis versé dans 5 ml de PBS. Deux lavages des cellules de l'anneau étaient réalisés avec une centrifugation pendant 5 min à 1200 rpm entre chaque lavage. Le culot cellulaire était ensuite resuspendu dans 5 ml de PBS s'ils devaient être analysés directement, ou dans la quantité nécessaire de sérum de veau fœtal (SVF) contenant 5 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) s'il devait être congelé à -80°C (Le Roux, 2022).

**Figure 33 : Répartition des différents éléments figurés sanguins après centrifugation (d'après Ota et Tanaka, 2017).**



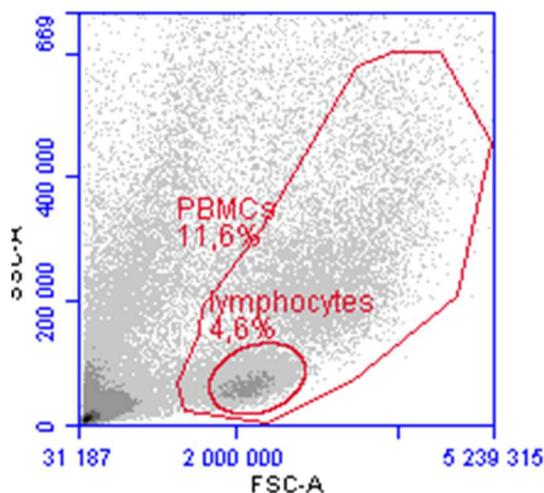
- *Protocole de marquage*

Avant le marquage par les anticorps, pour éviter la mort et donc la perte cellulaire, les cellules doivent être fixées. Pour cela, le culot de cellules (décongelées ou récupérées à partir de l'anneau de PBMCs et lavées deux fois) était resuspendu avec 5 ml de tampon phosphate salin (PBS) puis centrifugé à 1200rpm pendant 5min. Après centrifugation, le surnageant était jeté et le culot était resuspendu avec 1 ml de ParaFormaldéhyde (PFA) à 1% et incubé à température ambiante pendant 30min. Après incubation, les cellules fixées en PFA étaient diluées en tampon FACS (PBS + 1% d'albumine sérique bovine (BSA) ; 4mL par tube) puis centrifugées à 1200rpm pendant 5min. Le surnageant était ensuite éliminé et le culot était resuspendu dans la quantité suffisante de tampon FACS pour séparer le culot en différents tubes selon les marquages à effectuer (en général deux tubes : un pour les cellules non marquées, c'est-à-dire sans anticorps, et un qui recevra le mix d'anticorps pour marquage, selon les dilutions décrites dans le tableau 3). Une nouvelle centrifugation à 1200 rpm pendant 5 min était réalisée. Le surnageant était jeté et les culots suspendus avec les différentes combinaisons d'anticorps (Mix 1 et/ou 2 et/ou 3), préparées au préalable aux concentrations mentionnées ci-dessus dans du tampon FACS, de telle sorte à pouvoir administrer 50 µL par tube. 50µL de tampon FACS et de la combinaison d'anticorps étaient ensuite ajoutés respectivement dans les tubes témoins (NM) et testés (Mix). Une incubation de 30 minutes à température ambiante était respectée à la suite de laquelle les cellules étaient lavées avec 500µL de tampon FACS puis centrifugées à 1200rpm pendant 5min. Ceci était répété une deuxième fois et les culots cellulaires ensuite resuspendus avec 300 µL de PBS étaient enfin ajoutés dans chaque tube avant passage au cytomètre (Le Roux, 2022).

### b. Acquisition

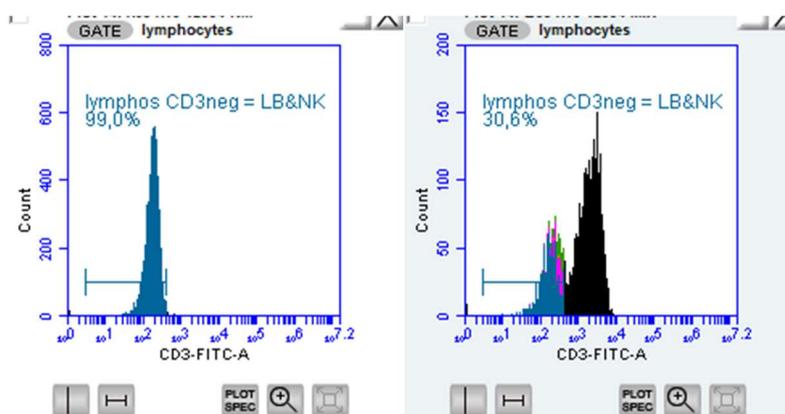
Une porte (ou « gate ») de PBMCs était définie sur le logiciel en fonction de la taille et de la granulosité attendue afin d'acquérir le nombre désiré de cellules. Un mode d'acquisition lent était sélectionné, et le cytomètre cessait son activité lorsque le volume liquide total du tube était atteint ou que 30 000 évènements (ou cellules) étaient comptabilisés au sein de la porte des PBMCs. La population lymphocytaire était ensuite sélectionnée parmi les PBMCs grâce à leurs caractéristiques de taille et de granulosité qui permet de les séparer des monocytes, autre population mononucléée présente dans l'anneau de PBMCs (Figure 34).

Figure 34 : Différentes portes sélectionnées sur le logiciel (PBMCs et lymphocytes).



Parmi ces lymphocytes, pour tous les échantillons, en premier, le marquage effectif du marqueur CD3 était testé comparativement entre les tubes « Mix » et non marqués (NM) (Figure 35).

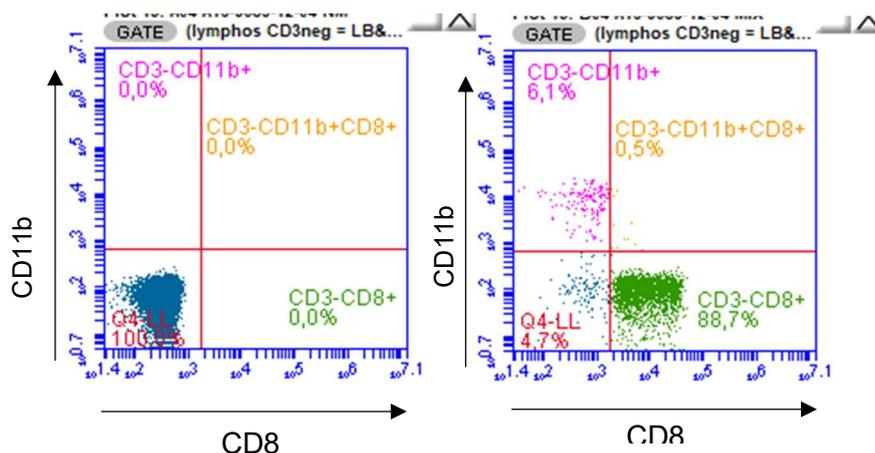
Figure 35 : Comparaison du marquage entre un échantillon incubé avec les marqueurs dont le CD3 (à droite) et son échantillon témoin (à gauche).



Pour les analyses, par la suite parmi la population lymphocytaire CD3-, qui correspond aux lymphocytes non-T (donc les lymphocytes B et les cellules NK entre autres), les deux autres marqueurs sélectionnés se voyaient à leur tour évalués (Figure 36) (soit CD5/CD8 (mix 1), soit CD11b/CD8 (mix 2) soit CD5/NKp46 (mix 3)). La figure 36 montre l'exemple de la stratégie de

sélection (ou « gating ») qui permet d'obtenir les différentes proportions cellulaires parmi les lymphocytes CD3-. Les résultats sont présentés dans la section suivante.

**Figure 36 : Exemple de vérification du marquage effectif des cellules par les deux autres marqueurs du mix 2 (à droite des cellules incubées avec les marqueurs, à gauche son échantillon témoin, les couleurs sont données de façon arbitraire et peuvent varier).**



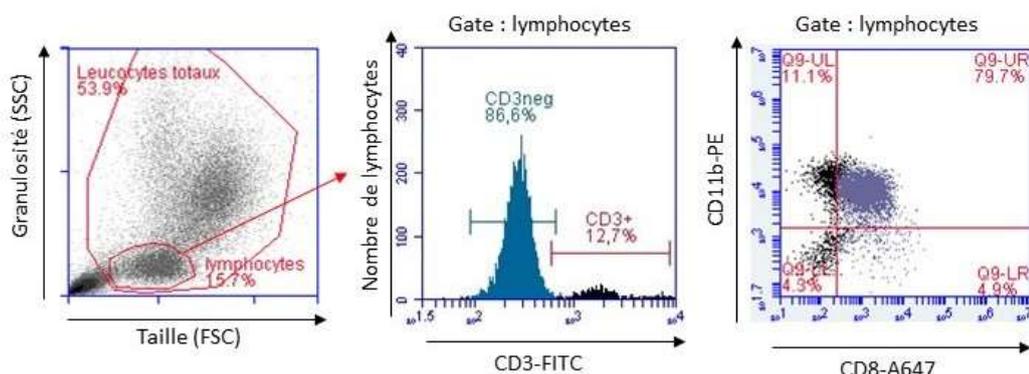
### 3. Résultats

#### A. Résultats du marquage avec le mix CD3/CD5/CD8

##### a. Résultats du marquage du chien à l'origine de cette thèse

Les PBMCs du chien à l'origine de cette thèse ont été fixées en PFA 1% le jour de la demande du diagnostic et ont été marquées avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD21, conformément à la demande des cliniciens pour statuer sur le phénotype des lymphocytes sanguin. La suspicion s'orientant vers un lymphome ou une leucémie, le marqueur CD34 avait été aussi demandé. Ces trois marquages se sont révélés négatifs pour les lymphocytes présents dans le sang du chien (résultats non montrés pour CD21 et CD34, et pour CD3 : cf figure 37 – panel du milieu). En effet, la majorité des lymphocytes de ce chien étaient négatifs pour CD3 (86,6%). Ainsi ces trois marqueurs étant négatifs, les marqueurs CD8+ et CD11b+ ont été testés le lendemain, sur les cellules restantes et non marquées le jour J (figure 37 – panel de droite). De façon intéressante, le phénotype des lymphocytes majoritairement présents dans le sang de ce chien était revenu CD3-/CD8+CD11b+.

**Figure 37 : Exemple de vérification du marquage effectif des cellules du chien à l'origine de cette thèse par les deux autres marqueurs du mix 2.**



Ce résultat surprenant a motivé la décision de tester ce panel d'anticorps afin de pouvoir identifier les cellules NK sans les marqueurs classiquement décrits et dont les anticorps ne sont pas disponibles dans le commerce. Ainsi, ces anticorps anti-CD8 et anti-CD11b, ont donc été testés sur d'autres PBMCs provenant de stocks congelés d'autres projets de recherche (cf partie 2.A.a – description des échantillons).

#### ***b. Résultats du marquage sur les PBMCs congelées***

Sur tous les échantillons testés pour le panel CD3/CD8/CD11b, 6 échantillons ont été écartés en raison de leur faible cellularité invalidant leur interprétation. Un total de 27 échantillons congelés a donc pu être analysé ; dont certains provenaient de chiens identiques mais prélevés à des temps différents (Tableau 4).

**Tableau 4 : Synthèse des différents pourcentages phénotypiques globaux des échantillons congelés.**  
« Moy » = moyenne

	Lymphocytes CD3- <i>Parmi la population de lymphocytes totaux</i>  <i>Moy(écart-type)</i>	Pourcentage de lymphocytes CD3- CD11b+CD8- <i>Parmi les lymphocytes CD3-</i>  <i>Moy(écart-type)</i>	Pourcentage de lymphocytes CD3- CD11b+CD8+ <i>Parmi les lymphocytes CD3-</i>  <i>Moy(écart-type)</i>	Pourcentage de lymphocytes CD3- CD11b- CD8+ <i>Parmi les lymphocytes CD3-</i>  <i>Moy(écart-type)</i>
Echantillons congelés (n=27)	38,7% (20,4)	6,1% (5,2)	0,1% (0,2)	8,3% (7,8)
Phénotype	LB et cellules NK	Possibles monocytes contaminants	Possibles cellules NK ?	Possibles cellules NK ?

L'analyse de ces résultats montrait un faible très pourcentage (0,1%) de cellules CD3-CD8+CD11b+ présent dans les PBMCs de ces échantillons (population putative de cellules NK du

sang périphérique). Cependant, un pourcentage plus élevé de cellules CD3-CD11b-CD8+ était fréquemment retrouvé avec une moyenne à 8,3% de cellules de ce phénotype parmi les lymphocytes CD3-. Ainsi, cette population pourrait éventuellement représenter une autre population de cellules NK canines. Ces résultats différant des initiaux, différentes comparaisons ont été réalisées par la suite. Notamment, il était important de savoir si la congélation des échantillons pouvait affecter l'expression de certains marqueurs.

### ***b. Comparaison des valeurs obtenues selon l'état de congélation***

Le fait de retrouver parmi les lymphocytes CD3- très peu de cellules CD11b+ et CD8+, a soulevé l'hypothèse que l'expression de ces marqueurs pouvait être affectée par la congélation. Ainsi, à partir de sang frais issus de chiens hospitalisés au service des urgences (« déchets biologiques »), les PBMCs obtenues ont été soit marquées tout de suite ou congelées pour un marquage ultérieur. Les PBMCs analysées directement après sélection sont notées « cellules fraîches ». Les PBMCs issues des mêmes individus et analysées après une période de congélation à - 80°C, sont qualifiées de « cellules congelées » (Parmi les échantillons retenus, un chien présentait à son admission une récurrence de pyothorax (chien 1), un autre un accident de la voie publique (chien 2), deux du mélena et de l'hématémèse (chiens 3 et 5), et un de la dyspnée (chien 4).

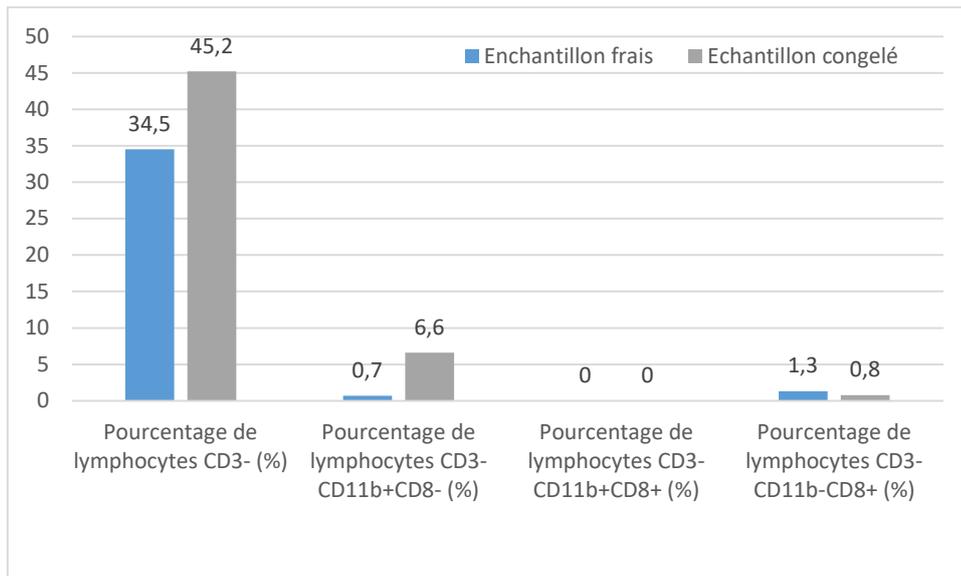
Tableau 55, Figures 39 à 43). Deux chiens ont été écartés en raison de la faible cellularité de leurs échantillons à la suite de la phase de préparation. Parmi les échantillons retenus, un chien présentait à son admission une récurrence de pyothorax (chien 1), un autre un accident de la voie publique (chien 2), deux du mélena et de l'hématémèse (chiens 3 et 5), et un de la dyspnée (chien 4).

**Tableau 5 : Comparaison collective des différents pourcentages phénotypiques globaux des échantillons frais et congelés.**

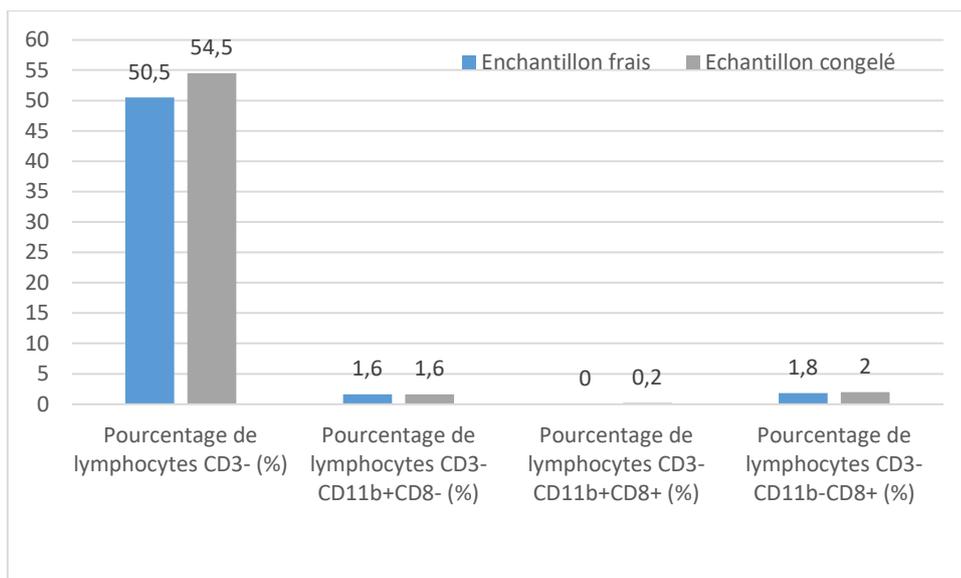
	<b>Lymphocytes CD3-</b> <i>Parmi la population de lymphocytes totaux</i>  <i>Moy(écart-type)</i>	Lymphocytes CD3- CD11b+CD8- <i>Parmi les lymphocytes CD3-</i>  <i>Moy(écart-type)</i>	Lymphocytes CD3- CD11b+CD8+ <i>Parmi les lymphocytes CD3-</i>  <i>Moy(écart-type)</i>	Lymphocytes CD3- CD11b-CD8+ <i>Parmi les lymphocytes CD3-</i>  <i>Moy(écart-type)</i>
Cellules Fraîches (n=5)	38,0% (9,8)	3,9% (2,6)	0,0% (0,0)	1,2% (0,7)
Cellules congelées (n=5)	34,6% (18,4)	6,4% (3,0)	0,1% (0,1)	1,2% (0,8)

Les pourcentages des populations CD11b+/CD8+, CD11b-CD8+ et CD11b+CD8- parmi les cellules CD3- variaient peu en fonction de l'état de congélation. Il est à noter cependant une légère augmentation du pourcentage de cellules CD3-CD11b+CD8-. Les figures ci-après détaillent les résultats sous forme de graphe pour chaque chien admis.

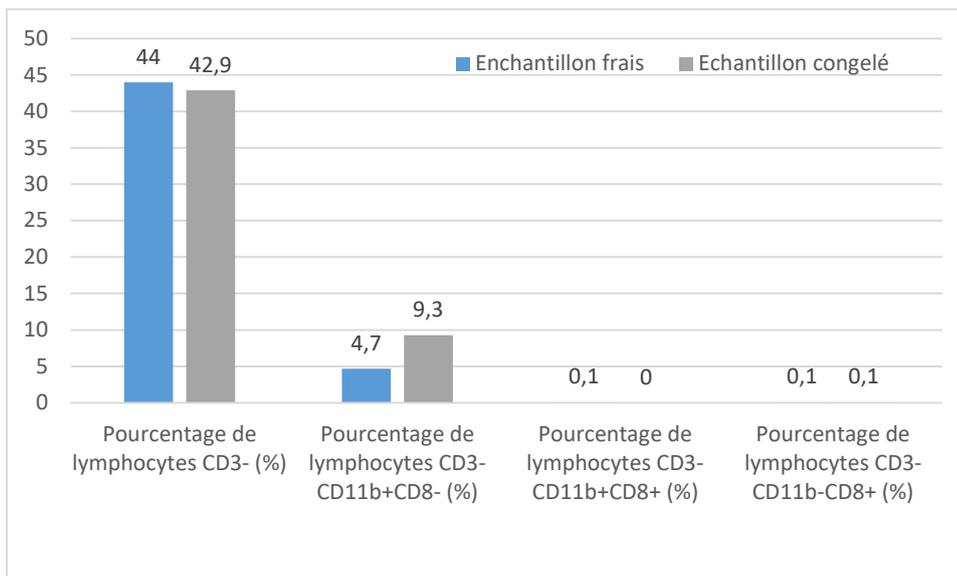
**Figure 38 : Comparaison des différents pourcentages phénotypiques selon l'état de congélation des échantillons du chien 1.**



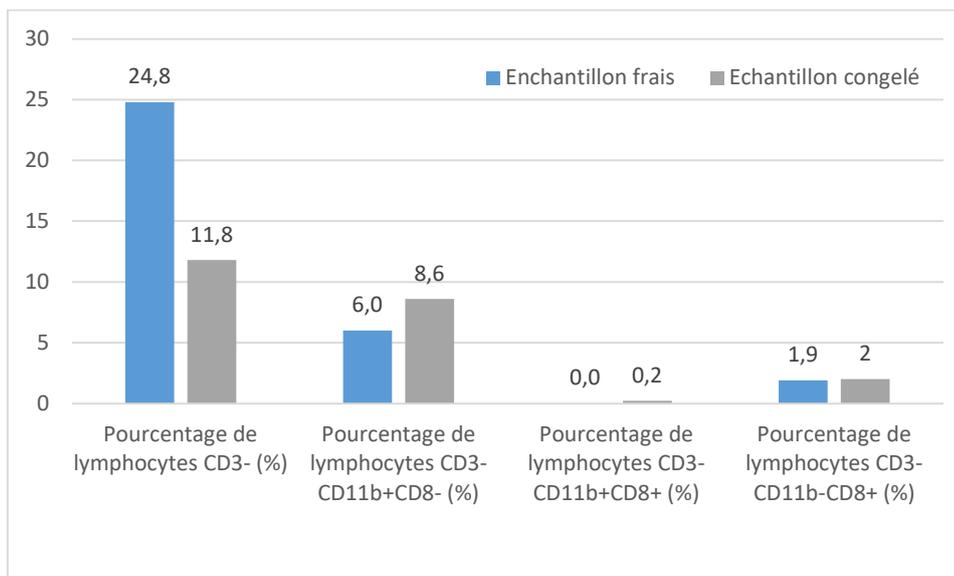
**Figure 39 : Comparaison des différents pourcentages phénotypiques selon l'état de congélation des échantillons du chien 2.**



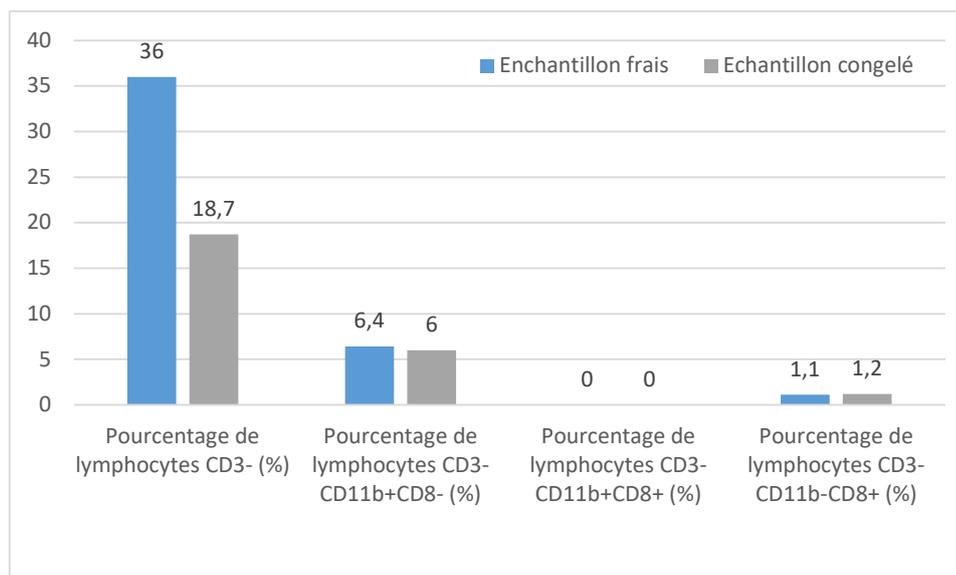
**Figure 40 : Comparaison des différents pourcentages phénotypiques selon l'état de congélation des échantillons du chien 3.**



**Figure 41 : Comparaison des différents pourcentages phénotypiques selon l'état de congélation des échantillons du chien 4.**



**Figure 42 : Comparaison des différents pourcentages phénotypiques selon l'état de congélation des échantillons du chien 5.**



**c. Effet du sexe sur les pourcentages des différentes populations parmi les cellules CD3-**

Afin d'établir s'il existe un effet du sexe sur les pourcentages des différentes populations lymphocytaires étudiées, une comparaison a été réalisée en fonction du sexe de l'animal (tableau 6)

**Tableau 6 : Comparaison collective des différents pourcentages phénotypiques selon le sexe.**

	<b>Lymphocytes CD3- Parmi la population de lymphocytes totaux</b>  Moy(écart-type)	Lymphocytes CD3-CD11b+CD8- Parmi les lymphocytes CD3-  Moy(écart-type)	Lymphocytes CD3-CD11b+CD8+ Parmi les lymphocytes CD3-  Moy(écart-type)	Lymphocytes CD3-CD11b-CD8+ Parmi les lymphocytes CD3-  Moy(écart-type)
Femelles entières (n = 8)	32,6 (24,0)	5,2 (6,1)	0,2 (0,2)	9,8 (11,7)
Femelles stérilisées (n = 8)	37,6 (17,7)	5,4 (5,8)	0,1 (0,1)	10,2 (5,2)
Mâles entiers (n = 6)	38,3 (14,4)	8,1 (5,2)	0,2 (0,1)	6,1 (6,1)
Mâles castrés (n = 3)	35,3 (15,8)	5,8 (4,3)	0,1 (0,1)	3,4 (4,5)

Les résultats présentés ici ne montraient pas de différence majeure de l'ordre grandeur des cellules CD3-CD8+CD11b+ des cellules en fonction du sexe des animaux sélectionnés (Tableau 6). On compte respectivement 3 et 2 échantillons provenant des mêmes animaux (femelles stérilisées) mais avec des dates de prélèvement différentes. Cependant, les femelles semblaient posséder plus de cellules CD3-CD8+CD11b- circulantes que les mâles (près de deux fois plus si les moyennes

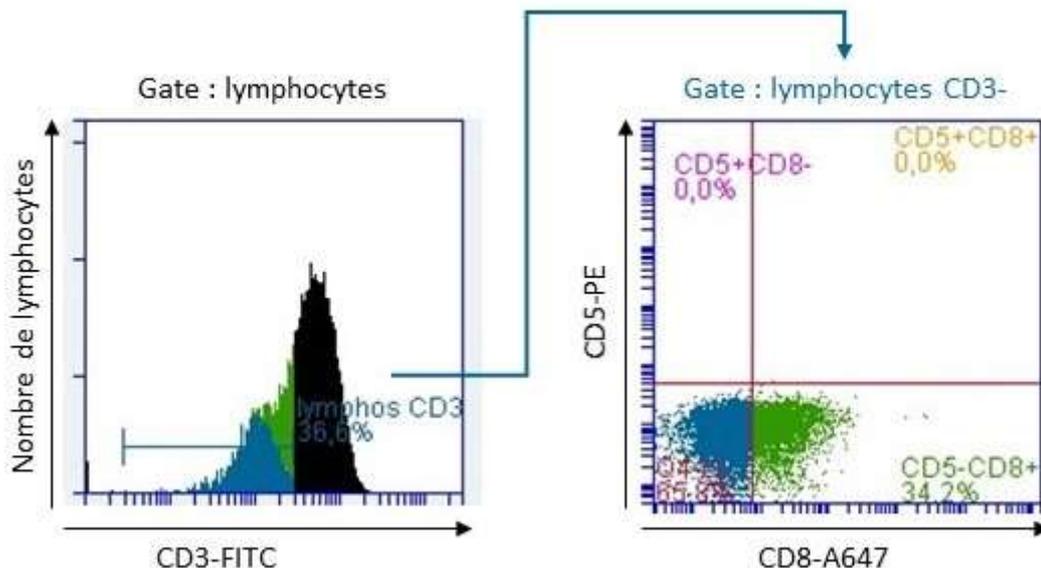
sont comparées), mais comme pour les mâles, la stérilisation ne semblait pas affecter ces pourcentages.

Suite à ces différents résultats, qui ne permettaient pas de conclure sur le phénotype NK des cellules CD3-CD11b-CD8+ et CD3-CD11b+CD8+, la décision a été prise de tester d'autres marqueurs phénotypiques utilisés dans la littérature pour identifier mieux les cellules NK par cytométrie de flux, c'est-à-dire CD5 et aussi NKp46. Les anticorps dirigés spécifiquement contre ces marqueurs n'étant pas disponibles en routine au BioPôle Alfort, des échantillons « tests » ont été fournis par Miltenyi, afin de profiter de ces essais pour déterminer s'il existe une réaction croisée, c'est-à-dire si ces anticorps, développés pour les molécules humaines, sont capables de reconnaître les formes canines, tout comme l'anti-CD11b-PE, provenant du même fournisseur.

### B. Résultats du marquage avec le mix CD3/CD5/CD8

L'ensemble des échantillons présents en double exemplaire et provenant de deux anciennes thèses (n = 21) a été testé avec le marqueur CD5 (avec l'hypothèse que les cellules NK soient CD5-voire CD5dim (Gingrich *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2008; Michael *et al.*, 2013b)). La figure 43 présente un exemple de marquage pour un échantillon.

**Figure 43 : Démonstration de l'absence de réactivité de l'anticorps anti-CD5 dans un des échantillons testés.**



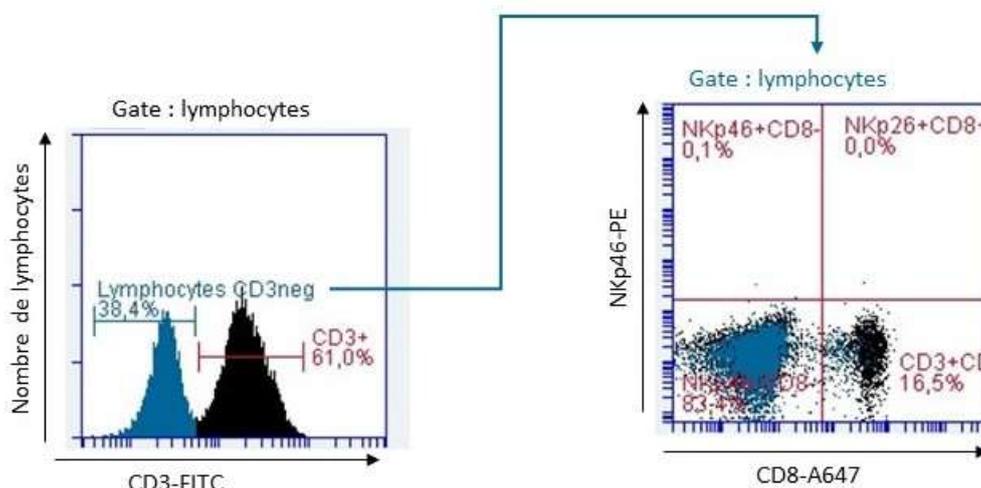
Une absence de marquage effectif du marqueur anti-CD5 était à noter concernant l'ensemble des échantillons testés (Figure 43). Ainsi, cet anticorps ne reconnaît pas la forme canine de CD5, les résultats de ce marquage réalisés sur les 21 échantillons n'étaient donc pas exploitables.

### C. Résultats du marquage avec le mix CD3/CD8/NKp46

Tout comme pour l'anti-CD5, un échantillon d'anticorps anti-NKp46 dirigé contre la forme humaine de la protéine, a été fourni au Biopôle Alfort, par Miltenyi Biotec pour être testé sur les PBMCs

canines, avec l'espoir d'une possible réaction croisée. La faible quantité de l'anticorps et les résultats négatifs avec l'anti-CD5 testé sur 21 échantillons, a motivé la décision de ne le tester que sur les cellules d'IZ, un chien dont l'échantillon avait été traité pour un immunophénotypage de lymphome ou leucémie, réalisé au BioPôle en mai 2022. Les résultats sont présentés dans la figure 44.

**Figure 44 : Démonstration de l'absence de réactivité du marqueur NKp46+ chez le chien IZ.**



Le chien présentait donc une majorité de lymphocytes CD3+ (61%) ce qui était attendu dans le sang (la valeur de référence pour les CD3+ circulantes est autour de 80 à 85%). Malheureusement, l'anticorps donné par Miltenyi Biotec ne semblait pas reconnaître la forme canine d'NKp46.

## 4. Discussion

Suite à un immunophénotypage par cytométrie de flux, réalisé sur un chien présentant un lymphome ou une leucémie à lymphocytes non-B non-T, l'hypothèse d'un lymphome à cellules NK avait été posée. Aucun d'anticorps spécifique des cellules NK canines n'était disponible commercialement au début de ce projet de thèse, et ces derniers sont actuellement très peu nombreux et difficilement disponibles. Ainsi, plusieurs marqueurs ont été choisis en fonction des anticorps disponibles au BioPôle et pouvant être exprimés par les cellules NK canines, selon la littérature retrouvée (cf. première partie de ce manuscrit). Les résultats de ce chien ont montré de façon intéressante, une population lymphocytaire majoritaire CD3-CD8+ et CD11b+. Une équipe (Grudzien *et al.*, 2021) a créé une lignée cellulaire canine CD3-CD8+ sur la base d'une néoplasie à cellules NK, mais cette lignée n'a pas été testée pour le marqueur CD11b. Cependant, il est aussi possible d'envisager une dérégulation aberrante de certains CD par les cellules néoplasiques, comme cela a déjà été décrit chez le chien (Comazzi et Riondato, 2021) notamment dans certains lymphomes T où une perte d'expression du CD3 ou du CD5 est parfois observée (Gelain *et al.*, 2008).

Sur la base de cet immunophénotype de lymphome ni B ni T et possiblement NK, la décision a été prise de tester l'expression des marqueurs CD3, CD8 et CD11b sur des lymphocytes provenant d'échantillons de PBMCs congelées et disponibles au BioPôle, à l'aide d'anticorps spécifiques, afin de pouvoir identifier des cellules de phénotype CD3-CD8+CD11b+ sur d'autres échantillons. Alors que le chien à l'origine de ce projet de thèse présentait une majorité de cellules CD3- qui étaient CD11b+ et CD8+, il s'avère que la majorité des échantillons testés présentaient plutôt des cellules CD3- et CD8+ mais CD11b-. En effet, les résultats mentionnés ci-dessus font état de taux compris entre 0,0 et 0,7 % de cellules CD3-CD8+CD11b+ pour une moyenne globale de 0,1 %. Aucun effet de la congélation des échantillons n'a été observé sur les pourcentages de ces différentes populations cellulaires, bien que certaines études ont montré que la congélation peut impacter négativement la viabilité et la fonction des cellules NK (Kisseberth et Lee, 2021). Pourtant, l'utilisation avec succès de cellules NK cryopréservées dans un contexte de transplantation chez l'Homme laisse envisager le contraire, ou a minima un effet moindre (Ciurea *et al.*, 2017; Kisseberth et Lee, 2021). De même, aucun effet du sexe n'a été relevé sur le taux de cellules CD3-CD8+CD11b+ parmi les lymphocytes, tandis que chez l'Homme il a été démontré que les hommes adultes détenaient un taux de cellules NK plus élevé que les femmes adultes (Huang *et al.*, 2021). En revanche dans la population testée les femelles semblaient détenir deux fois plus de cellules CD3-CD8+CD11b- que les mâles, bien que ces résultats nécessitent une investigation sur un plus grand nombre d'échantillons.

Les valeurs obtenues dans ce projet sont à comparer avec celles de la littérature. En effet des études récentes et basées sur les marquages spécifiques des cellules NK canines estiment que la population de cellules NK parmi les PBMCs représente entre 2,5 et 15% des lymphocytes périphériques (Gingrich *et al.*, 2019; Grøndahl-Rosado *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2008) sur la base respectivement des marqueurs NKp46 et CD5. Il a de plus été rapporté une expression du CD8 et CD11b variables (respectivement jusqu'à 30 % (Lin *et al.*, 2018, 2010) et entre 12 et 72% (chez des cellules CD3-CD5- dans le dernier cas de figure (Michael *et al.*, 2013a)). Dans les résultats présentés ici, les cellules CD3- parmi les lymphocytes des PBMCs congelées mais aussi à partir des cellules fraîches, représentent autour de 30% des lymphocytes totaux. Ces cellules, qui donc ne sont pas des lymphocytes T, sont majoritairement des lymphocytes B et des cellules NK. Afin d'écarter aussi les lymphocytes B, il aurait fallu rajouter un anticorps spécifique des LB (par exemple un anti-CD21). Or les fluorochromes associés aux anticorps disponibles pour ces marqueurs sont très limités et ne permettent pas de mettre 4 anticorps dans un même tube. Ainsi, une raison technique n'a pas permis de faire ce marquage. En effet, avec ce type de marquage, les cellules NK auraient pu être identifiées sur la base de la non-expression de marqueurs de LT et de LB (et donc CD3-CD21- parmi les lymphocytes circulants).

De même dans la littérature, le pourcentage de LT CD3+ circulant est autour de 80% ( $80,0 \pm 7,4$  (Faldyna *et al.*, 2001)) et des LB circulants (CD3-) est d'environ 15% ( $14,4 \pm 5,9$ ) parmi les lymphocytes totaux. Ici la moyenne des lymphocytes CD3- dans le sang des chiens admis aux urgences du CHUV-AC est légèrement supérieure (38% pour les cellules fraîchement marquées et 34,6% pour les cellules congelées plusieurs semaines, décongelées puis marquées).

Cependant, il est aussi important de noter que beaucoup des échantillons congelés provenaient de chiens souffrant de néoplasies diverses provenant de la thèse de Philippe Colombe (n=17) soutenue en 2020 : *Les biomarqueurs sanguins en oncologie comparée - état actuel des connaissances en 2020 - application aux cellules myéloïdes suppressives canines*) ou encore de

celle de Clémence Nadal soutenue en 2018 : *thèse expérimentale sur les cellules myéloïdes suppressives comme outil diagnostique potentiel des cancers canins* (n=10), et certains d'entre eux souffraient par exemple de syndromes lymphoprolifératifs (n=9) pouvant affecter les pourcentages des différentes populations lymphocytaires circulantes. Les chiens issus du service des Urgences et Soins Intensifs (URSI) du CHUV-AC de l'EnvA ne détenaient pas de néoplasies lors du prélèvement sanguin mais des pathologies inflammatoires et/ou infectieuses. En définitive seul un individu sain issu de la thèse de Philippe Colombe précédemment citée, a priori exempt de processus néoplasique ou infectieux, ou de signes rattachables, est inclus dans cette étude (avec pour cet échantillon 0,1 % de population CD8+/CD11b+ parmi la population de cellules lymphocytaires CD3-).

Au vu de ces résultats et après avoir analysé la littérature sur le phénotype des cellules NK canine, le marquage anti-CD5 et anti-NKp46 a été réalisé, en collaboration avec le fournisseur, afin de tester une potentielle réaction croisée de leurs anticorps spécifiques des formes humaines. Malheureusement ces anticorps n'ont pas présenté de réaction croisée, et les résultats ne sont donc pas interprétables. Cependant, une équipe américaine a réussi à obtenir à l'aide d'hybridome, un anticorps spécifique du NKp46 canin (Foltz *et al.*, 2016). Nous avons contacté l'équipe au cours de cette thèse, la réponse a été apportée le 29 juillet 2023, en proposant de nous envoyer un peu de surnageant. Cependant, l'équipe nous a également appris que leur anticorps était commercialement disponible chez Millipore, mais pour l'instant non couplé à un fluorochrome, ce qui rend un immunophénotypage par cytométrie de flux non pas impossible, mais plus complexe.

Une des limites de la cytométrie de flux est le phénotype « tout négatif ». En effet, il est impossible de décrire une population cellulaire sur la base de plusieurs marqueurs qui ne sont pas exprimés, comme CD3-CD21-CD4- qui indiquerait que ces cellules ne sont ni des LT CD4+ ni des LB mais sans avoir un caractère positif, il est impossible d'affirmer à 100% que ce sont des cellules NK, par élimination et sur la base unique de connaissances théoriques. Dans l'idéal, afin de pouvoir identifier clairement les cellules NK canines, il faudrait confirmer leur identité par des tests fonctionnels. En effet, les cellules NK sont douées d'un pouvoir cytotoxique puissant. De plus une des limites de la cytométrie de flux est le phénotype « tout négatif ». Il est de fait impossible de décrire une population cellulaire sur la base de plusieurs marqueurs qui ne sont pas exprimés, comme CD3-CD21-CD4- qui indiquerait que ces cellules ne sont ni des LT CD4+ ni des LB mais sans avoir un caractère positif, il est impossible d'affirmer à 100% que ce sont des cellules NK, par élimination et sur la base unique de connaissances théoriques. Ainsi, pouvoir trier ces cellules sur la base de leur phénotype, par un cytomètre de flux/trieur et de réaliser ensuite, avec les cellules triées, des tests de cytotoxicité sur des cellules-cibles par exemple, ou encore une analyse du transcriptome pourrait être envisagée. Dans ce sens, deux premières tentatives de tri cellulaire des 4 populations lymphocytaires (CD3-CD8-CD11b-/CD3-CD8+CD11b+/CD3-CD8-CD11b+/CD3-CD8+CD11b-), ont été réalisées. Chaque population triée a été colorée au May Grunwald Giemsa (MGG) afin de visualiser les caractéristiques morphologiques des cellules NK, notamment un cytoplasme plutôt azurophile et des granules intracytoplasmiques bleues foncées comme décrit par Brooks *et al.* (2022). Malheureusement, aucun de ces essais de tri n'a été concluant suite à des soucis techniques intervenus à différents niveaux et n'ont donc pas été présentés dans ce manuscrit.





# Conclusion

---

Si les cellules NK canines sont au centre de divers projets de recherche visant à exploiter leurs propriétés antitumorales, il existe encore à ce jour un manque de connaissances global à leur sujet, notamment concernant leur caractérisation ou encore leurs néoplasies. Dans ce sens un approfondissement du premier point bénéficierait probablement à l'appréhension du second, comme en témoigne à titre d'exemple le développement de thérapies antitumorales contre les lymphomes et leucémies à lymphocytes B basées sur la mise au point d'anticorps monoclonaux anti-CD20 canin et humain.

C'est dans ce but qu'a été entrepris un essai de caractérisation des cellules NK par cytométrie de flux (méthode ayant historiquement contribué à la caractérisation des troubles lymphoprolifératifs et à leur prise en charge adaptée (Bellesi *et al.*, 2023; Sagedal *et al.*, 2004)), avec les marqueurs disponibles au Biôpole Alfort. La combinaison testée dans cette thèse (CD3/CD8/CD11b, avec une population putative de cellules NK CD3-CD8+CD11b+) sur des PBMCs de chiens congelés a mis en évidence une population quantitativement faible de cellules CD3-CD8+CD11b+ (0,1% en moyenne parmi les lymphocytes) par rapport à la plus basse estimation disponible dans la littérature canine (2,5 % établis par Gingrich *et al.*, 2019). Si aucun effet de la congélation de l'échantillon ou bien du sexe de l'animal n'a pu être observé sur le pourcentage des cellules précédentes ; il apparaît que les femelles de l'échantillon détenaient un taux de cellules CD3-CD8+CD11b+ deux fois plus important que les mâles, résultat qui nécessiterait de plus amples investigations. D'autres marqueurs des cellules NK cités dans la littérature, ont pu être testés sur les PBMCs, tels que CD5 et NKp46, mais les anticorps fournis, spécifiques des formes humaines de ces protéines, n'ont pas reconnu les formes canines. De plus amples essais sont nécessaires, notamment sur un plus grand nombre de chiens sains pour pouvoir statuer sur le pourcentage physiologiques des cellules CD3-CD8+CD11b+, voire de déterminer une nouvelle combinaison de marqueurs. En effet de nombreux chiens inclus dans l'étude souffraient de néoplasies dont des syndromes lymphoprolifératifs, et de processus inflammatoires et infectieux pouvant potentiellement influencer sur les différents pourcentages retrouvés.

Ainsi, il serait nécessaire de mettre en place des caractérisations plus directes et/ou fonctionnelles des cellules CD3-CD11b-CD8+ et CD3-CD8+CD11b+ au BioPôle Alfort (comprenant par exemple une analyse du transcriptome, des tests de cytotoxicité, ou a minima une visualisation de la population en question entre autres). La mise au point d'une méthode d'identification fiable permettrait de pouvoir clairement discriminer les cellules NK canines et offrir ainsi un nouvel immunophénotypage aux cliniciens face à des lymphomes ou leucémies à lymphocytes non-B non-T ; en dépit d'une incidence très faible à ce jour des néoplasies provenant des cellules NK canines (une minorité des moins de 1,8% de lymphomes/leucémies à grands lymphocytes granuleux parmi les lymphomes qui représentent entre 7 et 24% des néoplasies canines (Jaensch *et al.*, 2022; Kotb *et al.*, 2021)).

# Liste des références bibliographiques

---

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. (2015) Cellular and molecular immunology. 8<sup>th</sup> Edition. St Louis, Elsevier.
- ABEL, A.M., YANG, C., THAKAR, M.S., *et al.* (2018) Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology* vol. 9. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>]
- ABLASSER, A., CHEN, Z.J. (2019) cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. *Science* vol. 363, n° 6431, p. eaat8657. [<https://doi.org/10.1126/science.aat8657>]
- ABRAMS, K., GRAVES, S.S., PARKER, M.H., *et al.* (2020) CD94 Ex Vivo Cultures in a Bone Marrow Transplantation Setting. *Transplantation Direct* vol. 6, n° 12, p. e632. [<https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000001082>]
- ADACHI, M., IGARASHI, H., OKAMOTO, M., *et al.* (2022) Large granular lymphocyte lymphoma in the skin and urinary bladder of a dog. *The Journal of Veterinary Medical Science* vol. 84, n° 2, p. 296-301. [<https://doi.org/10.1292/jvms.21-0201>]
- ADACHI, M., IGARASHI, H., OKAMOTO, M., *et al.* (2022) Large granular lymphocyte lymphoma in the skin and urinary bladder of a dog. *The Journal of Veterinary Medical Science* vol. 84, n° 2, p. 296. [<https://doi.org/10.1292/jvms.21-0201>]
- AGERBERTH, B., CHARO, J., WERR, J., *et al.* (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and  $\alpha$ -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* vol. 96, n° 9, p. 3086-3093. [<https://doi.org/10.1182/blood.V96.9.3086>]
- AKIYOSHI, M., HISASUE, M., NEO, S., *et al.* (2019) A case of hemophagocytic syndrome progressing into large granular lymphoma in a dog. *Veterinary Clinical Pathology* vol. 48, n° 1, p. 71-77. [<https://doi.org/10.1111/vcp.12704>]
- ALAGGIO, R., AMADOR, C., ANAGNOSTOPOULOS, I., *et al.* (2022) The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* vol. 36, n° 7, p. 1720-1748. [<https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>]
- ANDO, M., SUGIMOTO, K., KITO, T., *et al.* (2005) Selective apoptosis of natural killer-cell tumours by l-asparaginase. *British Journal of Haematology* vol. 130, n° 6, p. 860-868. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05694.x>]
- ARISTIZÁBAL, B., GONZÁLEZ, Á. (2013) Innate immune system. In *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Bogota, El Rosario University Press. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459455/>] (consulté le 04/04/2023)
- ARORA, G., HART, G.T., MANZELLA-LAPEIRA, J., *et al.* (2018) NK cells inhibit Plasmodium falciparum growth in red blood cells via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *eLife* vol. 7, p. e36806. [<https://doi.org/10.7554/eLife.36806>]
- ARTIS, D., SPITS, H. (2015) The biology of innate lymphoid cells. *Nature* vol. 517, n° 7534, p. 293-301. [<https://doi.org/10.1038/nature14189>]

- BARBER, G.N. (2015) STING: infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews. Immunology* vol. 15, n° 12, p. 760-770. [<https://doi.org/10.1038/nri3921>]
- BARR, C.A., ALVARADO, F., CHANG, Y.-M., *et al.* (2021) The impact of alfaxalone, propofol and ketamine on canine peripheral blood lymphocyte cytotoxicity in vitro. *Research in Veterinary Science* vol. 136, p. 182-184. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.02.019>]
- BEILKE, J.N., KUHL, N.R., VAN KAER, L., *et al.* (2005) NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nature Medicine* vol. 11, n° 10, p. 1059-1065. [<https://doi.org/10.1038/nm1296>]
- BELLESÌ, S., FIORITA, A., CORINA, L., *et al.* (2023) The role of flow cytometry for the timely diagnosis of lymphoma in the head and neck district. *Oral Oncology Reports* vol. 6, p. 100045. [<https://doi.org/10.1016/j.oor.2023.100045>]
- BENICHO, G., YAMADA, Y., AOYAMA, A., *et al.* (2011) Natural killer cells in rejection and tolerance of solid organ allografts. *Current Opinion in Organ Transplantation* vol. 16, n° 1, p. 47-53. [<https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e32834254cf>]
- BI, J., CUI, L., YU, G., *et al.* (2017) NK Cells Alleviate Lung Inflammation by Negatively Regulating Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Journal of Immunology* vol. 198, n° 8, p. 3336-3344. [<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601830>]
- BI, J., TIAN, Z. (2017) NK Cell Exhaustion. *Frontiers in Immunology* vol. 8. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00760>]
- BJÖRKSTRÖM, N.K., LJUNGGREN, H.-G., MICHAËLSSON, J. (2016) Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology* vol. 16, n° 5, p. 310-320. [<https://doi.org/10.1038/nri.2016.34>]
- BONILLA, F.A., OETTGEN, H.C. (2010) Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 125, n° 2, p. S33-S40. [<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>]
- BONKOBARA, M., SAITO, T., YAMASHITA, M., *et al.* (2007) Blastic natural killer cell leukaemia in a dog – A case report. *The Veterinary Journal* vol. 174, n° 3, p. 659-662. [<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.004>]
- BOSI, A., ZANELLATO, S., BASSANI, B., *et al.* (2018) Natural Killer Cells from Malignant Pleural Effusion Are Endowed with a Decidual-Like Proangiogenic Polarization. *Journal of Immunology Research* vol. 2018, p. e2438598. [<https://doi.org/10.1155/2018/2438598>]
- BOUZANI, M., OK, M., MCCORMICK, A., *et al.* (2011) Human NK Cells Display Important Antifungal Activity against *Aspergillus fumigatus*, Which Is Directly Mediated by IFN- $\gamma$  Release. *The Journal of Immunology* vol. 187, n° 3, p. 1369-1376. [<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003593>]
- BRANDSTADTER, J.D., YANG, Y. (2011) Natural Killer Cell Responses to Viral Infection. *Journal of Innate Immunity* vol. 3, n° 3, p. 274-279. [<https://doi.org/10.1159/000324176>]
- BRILLANTES, M., BEAULIEU, A.M. (2020) Memory and Memory-Like NK Cell Responses to Microbial Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 10. [<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00102>]

- BROOKS, M.B., HARR, K.E., SEELIG, D.M., *et al.* (2022) Schalm's veterinary hematology, 7<sup>th</sup> Edition. Ames, John Wiley & Sons.
- BRUNO, A., FOCACCETTI, C., PAGANI, A., *et al.* (2013) The Proangiogenic Phenotype of Natural Killer Cells in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia* vol. 15, n° 2, p. 133-147. [<https://doi.org/10.1593/neo.121758>]
- BRYCESON, Y.T., MARCH, M.E., LJUNGGREN, H.-G., *et al.* (2006) Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunological Reviews* vol. 214, n° 1, p. 73-91. [<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x>]
- BURRACK, K.S., HART, G.T., HAMILTON, S.E. (2019) Contributions of natural killer cells to the immune response against Plasmodium. *Malaria Journal* vol. 18, n° 1, p. 321. [<https://doi.org/10.1186/s12936-019-2953-1>]
- CANTER, R.J., GROSSENBACHER, S.K., FOLTZ, J.A., *et al.* (2017) Radiotherapy enhances natural killer cell cytotoxicity and localization in pre-clinical canine sarcomas and first-in-dog clinical trial. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* vol. 5, n° 1, p. 98. [<https://doi.org/10.1186/s40425-017-0305-7>]
- CARDILLO, F., VOLTARELLI, J.C., REED, S.G., *et al.* (1996) Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infection and Immunity* vol. 64, n° 1, p. 128-134. [<https://doi.org/10.1128/iai.64.1.128-134.1996>]
- CARDOSO ALVES, L., BERGER, M.D., KOUTSANDREAS, T., *et al.* (2020) Non-apoptotic TRAIL function modulates NK cell activity during viral infection. *EMBO Reports* vol. 21, n° 1, p. e48789. [<https://doi.org/10.15252/embr.201948789>]
- CERWENKA, A., LANIER, L.L. (2016) Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology* vol. 16, n° 2, p. 112-123. [<https://doi.org/10.1038/nri.2015.9>]
- CHEN, J., LIU, X., ZENG, Z., *et al.* (2020) Immunomodulation of NK Cells by Ionizing Radiation. *Frontiers in Oncology* vol. 10, p. 874. [<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00874>]
- CICHOCKI, F., WU, C.-Y., ZHANG, B., *et al.* (2018) ARID5B regulates metabolic programming in human adaptive NK cells. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 215, n° 9, p. 2379-2395. [<https://doi.org/10.1084/jem.20172168>]
- CIUREA, S.O., SCHAFER, J.R., BASSETT, R., *et al.* (2017) Phase 1 clinical trial using mBIL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood* vol. 130, n° 16, p. 1857-1868. [<https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-785659>]
- COLUCCI, F., CALIGIURI, M.A., DI SANTO, J.P. (2003) What does it take to make a natural killer? *Nature Reviews Immunology* vol. 3, n° 5, p. 413-425. [<https://doi.org/10.1038/nri1088>]
- COMAZZI, S., RIONDATO, F. (2021) Flow Cytometry in the Diagnosis of Canine T-Cell Lymphoma. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 8. [<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.600963>]
- COOPER, M.A., COLONNA, M., YOKOYAMA, W.M. (2009a) Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO Reports* vol. 10, n° 10, p. 1103-1110. [<https://doi.org/10.1038/embo.2009.203>]

- COOPER, M.A., ELLIOTT, J.M., KEYEL, P.A., *et al.* (2009b) Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 106, n° 6, p. 1915-1919. [<https://doi.org/10.1073/pnas.0813192106>]
- CORVINO, D., KUMAR, A., BALD, T. (2022) Plasticity of NK cells in Cancer. *Frontiers in Immunology* vol. 13. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.888313>]
- CÓZAR, B., GREPPI, M., CARPENTIER, S., *et al.* (2021) Tumor-infiltrating natural killer cells. *Cancer Discovery* vol. 11, n° 1, p. 34-44. [<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0655>]
- CRESPO, Â.C., MULIK, S., DOTIWALA, F., *et al.* (2020) Decidual NK cells transfer granulysin to selectively kill bacteria in trophoblasts. *Cell* vol. 182, n° 5, p. 1125- 1139.e18. [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.019>]
- CRINIER, A., NARNI-MANCINELLI, E., UGOLINI, S., *et al.* (2020a) SnapShot : Natural Killer Cells. *Cell* vol. 180, n° 6, p. 1280- 1280.e1. [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.029>]
- DADI, S., CHHANGAWALA, S., WHITLOCK, B.M., *et al.* (2016) Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells. *Cell* vol. 164, n° 3, p. 365-377. [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.002>]
- DE SANCTIS, J.B., GARMENDIA, J.V., HAJDÚCH, M. (2022) Overview of Memory NK Cells in Viral Infections: Possible Role in SARS-CoV-2 Infection. *Immuno* vol. 2, n° 1, p. 52-67. [<https://doi.org/10.3390/immuno2010005>]
- DEL ZOTTO, G., MARCENARO, E., VACCA, P., *et al.* (2017) Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* vol. 92, n° 2, p. 100-114. [<https://doi.org/10.1002/cyto.b.21508>]
- DI VITO, C., MIKULAK, J., MAVILIO, D. (2019) On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Frontiers in Immunology* vol. 10. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01812>]
- DRILLET, G., PASTORET, C., MOIGNET, A., *et al.* (2022) Toward a Better Classification System for NK-LGL Disorders. *Frontiers in Oncology* vol. 12, p. 821382. [<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.821382>]
- DUGAST, E., DAVID, G., OGER, R., *et al.* (2017) Broad Impairment of Natural Killer Cells From Operationally Tolerant Kidney Transplanted Patients. *Frontiers in Immunology* vol. 8, p. 1721. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01721>]
- EBERL, G., COLONNA, M., DI SANTO, J.P., *et al.* (2015) Innate Lymphoid Cells: a new paradigm in immunology. *Science* vol. 348, n° 6237, p. aaa6566. [<https://doi.org/10.1126/science.aaa6566>]
- EGASHIRA, M., KAWAMATA, N., SUGIMOTO, K., *et al.* (1999) P-Glycoprotein Expression on Normal and Abnormally Expanded Natural Killer Cells and Inhibition of P-Glycoprotein Function by Cyclosporin A and Its Analogue, PSC833. *Blood* vol. 93, n° 2, p. 599-606. [<https://doi.org/10.1182/blood.V93.2.599>]
- EGEA, L., HIRATA, Y., KAGNOFF, M.F. (2010) GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* vol. 4, n° 6, p. 723-731. [<https://doi.org/10.1586/egh.10.73>]

- ELLIOTT, J., VILLIERS, E. (2018) Indolent, T-cell, large granular lymphocytic leukaemia in a dog presenting with severe neutropenia and an absence of lymphocytosis. *Open Veterinary Journal* vol. 8, n° 2, p. 118-124. [<https://doi.org/10.4314/ovj.v8i2.1>]
- ENDSLEY, J.J., TORRES, A.G., GONZALES, C.M., *et al.* (2009) Comparative Antimicrobial Activity of Granulysin against Bacterial Biothreat Agents. *The Open Microbiology Journal* vol. 3, p. 92-96. [<https://doi.org/10.2174/1874285800903010092>]
- ERNST, W.A., THOMA-USZYNSKI, S., TEITELBAUM, R., *et al.* (2000) Granulysin, a T Cell Product, Kills Bacteria by Altering Membrane Permeability<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology* vol. 165, n° 12, p. 7102-7108. [<https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.7102>]
- FAAS, M.M., DE VOS, P. (2017) Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta* vol. 56, p. 44-52. [<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.03.001>]
- FAJGENBAUM, D.C., JUNE, C.H. (2020) Cytokine Storm. *The New England Journal of Medicine* vol. 383, n° 23, p. 2255-2273. [<https://doi.org/10.1056/NEJMra2026131>]
- FALDYNA, M., LEVÁ, L., KNÖTIGOVÁ, P., *et al.* (2001) Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs — a flow cytometric study. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 82, n° 1, p. 23-37. [[https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00337-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00337-3)]
- FEEHAN, D.D., JAMIL, K., POLYAK, M.J., *et al.* (2022) Natural killer cells kill extracellular *Pseudomonas aeruginosa* using contact-dependent release of granzymes B and H. *PLoS Pathogens* vol. 18, n° 2, p. e1010325. [<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010325>]
- FERLAZZO, G., CARREGA, P. (2012) Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Frontiers in Immunology* vol. 3. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00347>]
- FOLEY, B., COOLEY, S., VERNERIS, M.R., *et al.* (2012) Human CMV-induced Memory-like NKG2C<sup>+</sup> NK cells are Transplantable and Expand in vivo in Response to Recipient CMV Antigen. *Journal of Immunology* vol. 189, n° 10, p. 5082-5088. [<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201964>]
- FOLTZ, J.A., SOMANCHI, S.S., YANG, Y., *et al.* (2016) NCR1 Expression Identifies Canine Natural Killer Cell Subsets with Phenotypic Similarity to Human Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology* vol. 7. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00521>]
- FORGASH, J.T., CHANG, Y., MITTELMAN, N.S., *et al.* (2021) Clinical features and outcome of acquired myasthenia gravis in 94 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 35, n° 5, p. 2315-2326. [<https://doi.org/10.1111/jvim.16223>]
- FU, B., TIAN, Z., WEI, H. (2014) Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology* vol. 141, n° 4, p. 483-489. [<https://doi.org/10.1111/imm.12224>]
- GANG, M., WONG, P., BERRIEN-ELLIOTT, M.M., *et al.* (2020) Memory-like natural killer cells for cancer immunotherapy. *Seminars in Hematology* vol. 57, n° 4, p. 185-193. [<https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2020.11.003>]
- GE, M., YANG, C., LI, T., *et al.* (2023) Circulating CXCR5 + natural killer cells are expanded in patients with myasthenia gravis. *Clinical & Translational Immunology* vol. 12, n° 5, p. e1450. [<https://doi.org/10.1002/cti2.1450>]

- GEIGER, T.L., SUN, J.C. (2016) Development and Maturation of Natural Killer Cells. *Current Opinion in Immunology* vol. 39, p. 82-89. [<https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.01.007>]
- GELAIN, M.E., MAZZILLI, M., RIONDATO, F., *et al.* (2008) Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 121, n° 3, p. 179-188. [<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.018>]
- GENTILE, M.E., LI, Y., ROBERTSON, A., *et al.* (2020) NK cell recruitment limits tissue damage during an enteric helminth infection. *Mucosal Immunology* vol. 13, n° 2, p. 357-370. [<https://doi.org/10.1038/s41385-019-0231-8>]
- GERSHWIN, M.E., ANSARI, A.A., MACKAY, I.R., *et al.* (2000) Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunological Reviews* vol. 174, p. 210-225. [<https://doi.org/10.1034/j.1600-0528.2002.017402.x>]
- GINGRICH, A.A., MODIANO, J.F., CANTER, R.J. (2019) Characterization and Potential Applications of Dog Natural Killer Cells in Cancer Immunotherapy. *Journal of Clinical Medicine* vol. 8, n° 11, p. 1802. [<https://doi.org/10.3390/jcm8111802>]
- GINGRICH, A.A., REITER, T.E., JUDGE, S.J., *et al.* (2021) Comparative Immunogenomics of Canine Natural Killer Cells as Immunotherapy Target. *Frontiers in Immunology* vol. 12. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.670309>]
- GISMONDI, A., BERNARDINI, G., SANTONI, A. (2010) NK cells and chemokines. *Natural Killer Cells* p. 203-213. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370454-2.00015-6>]
- GOH, W., HUNTINGTON, N.D. (2017) Regulation of Murine Natural Killer Cell Development. *Frontiers in Immunology* vol. 8, p. 130. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00130>]
- GRAVES, S.S., GYURKOCZA, B., STONE, D.M., *et al.* (2019) Development and characterization of a canine-specific anti-CD94 (KLRD-1) monoclonal antibody. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 211, p. 10-18. [<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.03.005>]
- GRAVES, S.S., STORB, R. (2020) Developments and Translational Relevance for the Canine Hematopoietic Cell Transplantation Preclinical Model. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 18, n° 4, p. 471. [<https://doi.org/10.1111/vco.12608>]
- GRØNDAHL-ROSADO, C., BØNSDORFF, T.B., BRUN-HANSEN, H.C., *et al.* (2015) NCR1+ cells in dogs show phenotypic characteristics of natural killer cells. *Veterinary Research Communications* vol. 39, n° 1, p. 19-30. [<https://doi.org/10.1007/s11259-014-9624-z>]
- GRØNDAHL-ROSADO, C., BOYSEN, P., JOHANSEN, G.M., *et al.* (2016) NCR1 is an activating receptor expressed on a subset of canine NK cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 177, p. 7-15. [<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.05.001>]
- GRUDZIEN, M., PAWLAK, A., KUTKOWSKA, J., *et al.* (2021) A newly established canine NK-type cell line and its cytotoxic properties. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 19, n° 3, p. 567-577. [<https://doi.org/10.1111/vco.12695>]

- GUAN, Y., CHAMBERS, C.B., TABATABAI, T., *et al.* (2020) Renal cell tumors convert natural killer cells to a proangiogenic phenotype. *Oncotarget* vol. 11, n° 26, p. 2571-2585. [<https://doi.org/10.18632/oncotarget.27654>]
- HARABUCHI, Y., IMAI, S., WAKASHIMA, J., *et al.* (1996) Nasal T-cell lymphoma causally associated with Epstein-Barr virus: Clinicopathologic, phenotypic, and genotypic studies. *Cancer* vol. 77, n° 10, p. 2137-2149. [[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960515\)77:10<2137::AID-CNCR27>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19960515)77:10<2137::AID-CNCR27>3.0.CO;2-V)]
- HARABUCHI, Y., TAKAHARA, M., KISHIBE, K., *et al.* (2019) Extranodal Natural Killer/T-Cell Lymphoma, Nasal Type : Basic Science and Clinical Progress. *Frontiers in Pediatrics* vol. 7. [<https://doi.org/10.3389/fped.2019.00141>]
- HARVEY, D., POINTON, J.J., SLEATOR, C., *et al.* (2009) Analysis of killer immunoglobulin-like receptor genes in ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* vol. 68, n° 4, p. 595-598. [<https://doi.org/10.1136/ard.2008.095927>]
- HAYAKAWA, Y., HUNTINGTON, N.D., NUTT, S.L., *et al.* (2006) Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunological Reviews* vol. 214, n° 1, p. 47-55. [<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00454.x>]
- HEEB, H.L., WILKERSON, M.J., CHUN, R., *et al.* (2003) Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive Ehrlichia serology in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* vol. 39, n° 4, p. 379-384. [<https://doi.org/10.5326/0390379>]
- HIGHTON, A.J., SCHUSTER, I.S., DEGLI-ESPOSTI, M.A., *et al.* (2021) The role of natural killer cells in liver inflammation. *Seminars in Immunopathology* vol. 43, n° 4, p. 519-533. [<https://doi.org/10.1007/s00281-021-00877-6>]
- HU, W., WANG, G., HUANG, D., *et al.* (2019) Cancer Immunotherapy Based on Natural Killer Cells : Current Progress and New Opportunities. *Frontiers in Immunology* vol. 10. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01205>]
- HUANG, Y.-C., HUNG, S.-W., JAN, T.-R., *et al.* (2008) CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood show characteristics of natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology* vol. 84, n° 6, p. 1501-1510. [<https://doi.org/10.1189/jlb.0408255>]
- HUANG, Z., CHEN, B., LIU, X., *et al.* (2021) Effects of sex and aging on the immune cell landscape as assessed by single-cell transcriptomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 118, n° 33, p. e2023216118. [<https://doi.org/10.1073/pnas.2023216118>]
- HÜBER, C.M., DOISNE, J., COLUCCI, F. (2015) IL-12/15/18-preactivated NK cells suppress GvHD in a mouse model of mismatched hematopoietic cell transplantation. *European Journal of Immunology* vol. 45, n° 6, p. 1727-1735. [<https://doi.org/10.1002/eji.201445200>]
- HWANG, D.W., SOHN, D.-H., KI, Y.W., *et al.* (2022) Natural Killer Cells Improve Cognitive Function and Support to Induce Amyloid Beta Clearance by Functional Recovery of Impaired Microglia in Natural Killer Cell-treated Alzheimer's Diseases Mouse Model. *Alzheimer's & Dementia* vol. 18, n° S10, p. e061720. [<https://doi.org/10.1002/alz.061720>]

- ISHIDA, F. (2018) Aggressive NK-Cell Leukemia. *Frontiers in Pediatrics* vol. 6. [https://doi.org/10.3389/fped.2018.00292]
- ISHIDA, F., KO, Y.H., KIM, W.S., *et al.* (2012) Aggressive natural killer cell leukemia: Therapeutic potential of l-asparaginase and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Science* vol. 103, n° 6, p. 1079-1083. [https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02251.x]
- ITO, A., SHIMURA, H., NITAHARA, A., *et al.* (2008) NK cells contribute to the skin graft rejection promoted by CD4+ T cells activated through the indirect allorecognition pathway. *International Immunology* vol. 20, n° 10, p. 1343-1349. [https://doi.org/10.1093/intimm/dxn092]
- JADIDI-NIARAGH, F., SHEGARFI, H., NADDAFI, F., *et al.* (2012) The Role of Natural Killer Cells in Alzheimer's Disease. *Scandinavian Journal of Immunology* vol. 76, n° 5, p. 451-456. [https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02769.x]
- JAENSCH, S., HAYWARD, D., BOYD, S. (2022) Clinicopathologic and immunophenotypic features in dogs with presumptive large granular lymphocyte leukaemia. *Australian Veterinary Journal* vol. 100, n° 11, p. 527-532. [https://doi.org/10.1111/avj.13199]
- JAFFE, E.S. (2020) T-cell and NK-cell neoplasms of the gastrointestinal tract – recurrent themes, but clinical and biological distinctions exist. *Haematologica* vol. 105, n° 7, p. 1760-1762. [https://doi.org/10.3324/haematol.2020.252924]
- JEON, Y.K., KIM, J.-H., SUNG, J.-Y., *et al.* (2015) Epstein-Barr virus–positive nodal T/NK-cell lymphoma: an analysis of 15 cases with distinct clinicopathological features. *Human Pathology* vol. 46, n° 7, p. 981-990. [https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.03.002]
- JONES, G.J., WISEMAN, J.C.D., MARR, K.J., *et al.* (2009) In contrast to anti-tumor activity, YT cell and primary NK cell cytotoxicity for *Cryptococcus neoformans* bypasses LFA-1. *International Immunology* vol. 21, n° 4, p. 423-432. [https://doi.org/10.1093/intimm/dxp010]
- JUNG, K.S., CHO, S.-H., KIM, S.J., *et al.* (2016) l-asparaginase-based regimens followed by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation improve outcomes in aggressive natural killer cell leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* vol. 9, n° 1, p. 41. [https://doi.org/10.1186/s13045-016-0271-4]
- KABASHIMA, K., WEIDINGER, S. (2020) NK cells as a possible new player in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 146, n° 2, p. 276-277. [https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.052]
- KANG, S., BROWN, H.M., HWANG, S. (2018) Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. *Immune Network* vol. 18, n° 5, p. e33. [https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e33]
- KILDEY, K., FRANCIS, R.S., HULTIN, S., *et al.* (2019) Specialized Roles of Human Natural Killer Cell Subsets in Kidney Transplant Rejection. *Frontiers in Immunology* vol. 10, p. 1877. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01877]
- KIM, C.-J., PARK, S.-C., LEE, S.-H., *et al.* (2022) Safety analysis of ex vivo-expanded canine natural killer cells in a xenogeneic mouse model of graft-versus-host disease. *Journal of Leukocyte Biology* vol. 111, n° 2, p. 439-450. [https://doi.org/10.1002/JLB.5A1019-501RR]

- KIM, W.Y., MONTES-MOJARRO, I.A., FEND, F., *et al.* (2019) Epstein-Barr Virus-Associated T and NK-Cell Lymphoproliferative Diseases. *Frontiers in Pediatrics* vol. 7. [https://doi.org/10.3389/fped.2019.00071]
- KIMURA, H., FUJIWARA, S. (2019) Overview of EBV-Associated T/NK-Cell Lymphoproliferative Diseases. *Frontiers in Pediatrics* vol. 6. [https://doi.org/10.3389/fped.2018.00417]
- KISSEBERTH, W.C., LEE, D.A. (2021) Adoptive Natural Killer Cell Immunotherapy for Canine Osteosarcoma. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 8, p. 672361. [https://doi.org/10.3389/fvets.2021.672361]
- KNAPP, D.W., LEIBNITZ, R.R., DENICOLA, D.B., *et al.* (1993) Measurement of NK activity in effector cells purified from canine peripheral lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 35, n° 3, p. 239-251. [https://doi.org/10.1016/0165-2427(93)90037-5]
- KOJO, S., SEINO, K.-I., HARADA, M., *et al.* (2005) Induction of regulatory properties in dendritic cells by Valpha14 NKT cells. *Journal of Immunology* vol. 175, n° 6, p. 3648-3655. [https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3648]
- KOO, Y. young, LEE, J., KIM, B., *et al.* (2021) Natural Killer-cell Enteropathy Stomach in an Elderly Woman : A Case Report. *The Korean Journal of Gastroenterology* vol. 78, n° 6, p. 349-352. [https://doi.org/10.4166/kjg.2021.116]
- KOTB, S., ALLENDE, C., O'NEILL, T.W., *et al.* (2021) A case of canine renal lymphoma of granular lymphocytes with severe polycythemia. *BMC Veterinary Research* vol. 17, n° 1, p. 163. [https://doi.org/10.1186/s12917-021-02854-5]
- KRIJGSMAN, D., DE VRIES, N.L., SKOVBO, A., *et al.* (2019) Characterization of circulating T-, NK-, and NKT cell subsets in patients with colorectal cancer: the peripheral blood immune cell profile. *Cancer Immunology, Immunotherapy* vol. 68, n° 6, p. 1011-1024. [https://doi.org/10.1007/s00262-019-02343-7]
- KRIJGSMAN, D., HOKLAND, M., KUPPEN, P.J.K. (2018) The Role of Natural Killer T Cells in Cancer—A Phenotypical and Functional Approach. *Frontiers in Immunology* vol. 9. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00367]
- KUCUKSEZER, U.C., AKTAS CETIN, E., ESEN, F., *et al.* (2021) The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* vol. 12. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.622306]
- KUENDEE, N., PUTHIER, D., NGUYEN, C., *et al.* (2021) Activation-induced cell death of NK cells in canine atopic dermatitis revealed by Droplet-Sequencing data of peripheral blood mononuclear cells. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* vol. 51, n° 4, p. 743-751. [https://doi.org/10.14456/tjvm.2021.90Original]
- KUNZMANN, V., KRETZSCHMAR, E., HERRMANN, T., *et al.* (2004) Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human  $\gamma\delta$  T cells via CD11c+ dendritic cell-derived type I interferons. *Immunology* vol. 112, n° 3, p. 369-377. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01908.x]
- LAMY, T., MOIGNET, A., LOUGHRAN, T.P., Jr (2017) LGL leukemia: from pathogenesis to treatment. *Blood* vol. 129, n° 9, p. 1082-1094. [https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-692590]

- LANGERS, I., RENOUX, V.M., THIRY, M., *et al.* (2012) Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics : Targets & Therapy* vol. 6, p. 73-82. [<https://doi.org/10.2147/BTT.S23976>]
- LAZARCHICK, J. (2004) NK Cell Lymphocytosis - 5. *In American Society of Hematology*. [<https://imagebank.hematology.org/collection/2719>] (consulté le 30/08/2023).
- LE ROUX, D. (2022) Protocole marquage NK de chien à partir de PBMCs congelées, document interne au Biopôle Alfort.
- LEE, J., LEE, S.-A., GU, N.-Y., *et al.* (2021) Canine Natural Killer Cell-Derived Exosomes Exhibit Antitumor Activity in a Mouse Model of Canine Mammary Tumor. *BioMed Research International* vol. 2021, p. e6690704. [<https://doi.org/10.1155/2021/6690704>]
- LEE, S.-H., MIYAGI, T., BIRON, C.A. (2007) Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends in Immunology* vol. 28, n° 6, p. 252-259. [<https://doi.org/10.1016/j.it.2007.04.001>]
- LEE, S.-H., SHIN, D.-J., KIM, Y., *et al.* (2018) Comparison of Phenotypic and Functional Characteristics Between Canine Non-B, Non-T Natural Killer Lymphocytes and CD3+CD5dimCD21- Cytotoxic Large Granular Lymphocytes. *Frontiers in Immunology* vol. 9. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00841>]
- LEVI, I., AMSALEM, H., NISSAN, A., *et al.* (2015) Characterization of tumor infiltrating natural killer cell subset. *Oncotarget* vol. 6, n° 15, p. 13835-13843. [<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3453>]
- LI, C., TIAN, Y., WANG, J., *et al.* (2014) Abnormal immunophenotype provides a key diagnostic marker: a report of 29 cases of de novo aggressive natural killer cell leukemia. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* vol. 163, n° 6, p. 565-577. [<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.01.010>]
- LI, S.S., KYEI, S.K., TIMM-MCCANN, M., *et al.* (2013) The NK Receptor NKp30 Mediates Direct Fungal Recognition and Killing and Is Diminished in NK Cells from HIV-Infected Patients. *Cell Host & Microbe* vol. 14, n° 4, p. 387-397. [<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.09.007>]
- LI, X.-F., DAI, D., SONG, X.-Y., *et al.* (2017) A different representation of natural T cells and natural killer cells between tumor-infiltrating and periphery lymphocytes in human hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters* vol. 13, n° 5, p. 3291-3298. [<https://doi.org/10.3892/ol.2017.5808>]
- LIEKE, T., GRAEFE, S.E.B., KLAUENBERG, U., *et al.* (2004) NK Cells Contribute to the Control of *Trypanosoma cruzi* Infection by Killing Free Parasites by Perforin-Independent Mechanisms. *Infection and Immunity* vol. 72, n° 12, p. 6817-6825. [<https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6817-6825.2004>]
- LIMA, M. (2013) Aggressive mature natural killer cell neoplasms: from epidemiology to diagnosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* vol. 8, p. 95. [<https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-95>]
- LIMA, M., ALMEIDA, J., MONTERO, A.G., *et al.* (2004) Clinicobiological, Immunophenotypic, and Molecular Characteristics of Monoclonal CD56-/+dim Chronic Natural Killer Cell Large Granular Lymphocytosis. *The American Journal of Pathology* vol. 165, n° 4, p. 1117-1127. [[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63373-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63373-1)]

- LIN, C.S., CHANG, C.P., CHIANG, H.C., *et al.* (2018) Activating natural killer (NK) cytotoxicity of canine CD5-CD21- cells requires low surface CD5 density NK cells. *Iranian Journal of Veterinary Research* vol. 19, n° 2, p. 87-95.
- LIN, J.H., YAMAZAKI, M. (2003) Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics* vol. 42, n° 1, p. 59-98. [<https://doi.org/10.2165/00003088-200342010-00003>]
- LIN, Y.-C., HUANG, Y.-C., WANG, Y.-S., *et al.* (2010) Canine CD8 T cells showing NK cytotoxic activity express mRNAs for NK cell-associated surface molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 133, n° 2-4, p. 144-153. [<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.07.013>]
- LIU, M., LIANG, S., ZHANG, C. (2021) NK Cells in Autoimmune Diseases : Protective or Pathogenic ? *Frontiers in Immunology* vol. 12. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.624687>]
- LIU, R.-T., LI, W., GUO, D., *et al.* (2021) Natural killer cells promote the differentiation of follicular helper T cells instead of inducing apoptosis in myasthenia gravis. *International Immunopharmacology* vol. 98, p. 107880. [<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107880>]
- LIU, X., LI, L., SI, F., *et al.* (2021) NK and NKT cells have distinct properties and functions in cancer. *Oncogene* vol. 40, n° 27, p. 4521-4537. [<https://doi.org/10.1038/s41388-021-01880-9>]
- LO NIGRO, C., MACAGNO, M., SANGIOLO, D., *et al.* (2019) NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Annals of Translational Medicine* vol. 7, n° 5, p. 105. [<https://doi.org/10.21037/atm.2019.01.42>]
- LODOLCE, J.P., BURKETT, P.R., KOKA, R.M., *et al.* (2002) Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. *Cytokine & Growth Factor Reviews* vol. 13, n° 6, p. 429-439. [[https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00029-1)]
- LONG, E.O. (2007) Ready for Prime Time: NK Cell Priming by Dendritic Cells. *Immunity* vol. 26, n° 4, p. 385-387. [<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.001>]
- LONGHI, L.N.A., DA SILVA, R.M., FORNAZIM, M.C., *et al.* (2012) Phenotypic and Functional Characterization of NK Cells in Human Immune Response against the Dimorphic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *The Journal of Immunology* vol. 189, n° 2, p. 935-945. [<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102563>]
- LÓPEZ-BOTET, M., DE MARIA, A., MUNTASELL, A., *et al.* (2023) Adaptive NK cell response to human cytomegalovirus: Facts and open issues. *Seminars in Immunology* vol. 65, p. 101706. [<https://doi.org/10.1016/j.smim.2022.101706>]
- LÓPEZ-BOTET, M., VILCHES, C., REDONDO-PACHÓN, D., *et al.* (2017) Dual Role of Natural Killer Cells on Graft Rejection and Control of Cytomegalovirus Infection in Renal Transplantation. *Frontiers in Immunology* vol. 8. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00166>]
- LOZANO, J.J., PALLIER, A., MARTINEZ-LLORDELLA, M., *et al.* (2011) Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. *American Journal of Transplantation* vol. 11, n° 9, p. 1916-1926. [<https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03638.x>]

- LUETKE-EVERSLOH, M., KILLIG, M., ROMAGNANI, C. (2013) Signatures of Human NK Cell Development and Terminal Differentiation. *Frontiers in Immunology* vol. 4. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00499]
- MACK, M.R., BRESTOFF, J.R., BERRIEN-ELLIOTT, M.M., *et al.* (2020) Blood natural killer cell deficiency reveals an immunotherapy strategy for atopic dermatitis. *Science Translational Medicine* vol. 12, n° 532, p. eaay1005. [https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay1005]
- MAGHAZACHI, A.A. (2010) Role of Chemokines in the Biology of Natural Killer Cells. In Bruserud, O. (Éd.), *The Chemokine System in Experimental and Clinical Hematology, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg, Springer, p. 37-58. [https://doi.org/10.1007/82\_2010\_20]
- MAH, A.Y., COOPER, M.A. (2016) Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- $\gamma$  Production. *Critical Reviews in Immunology* vol. 36, n° 2, p. 131-147. [https://doi.org/10.1615/CritRevImmuno.2016017387]
- MANCINI, M., VIDAL, S.M. (2020) Mechanisms of Natural Killer Cell Evasion Through Viral Adaptation. *Annual Review of Immunology* vol. 38, n° 1, p. 511-539. [https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-082619-124440]
- MANSOOR, A., PITTALUGA, S., BECK, P.L., *et al.* (2011) NK-cell enteropathy: a benign NK-cell lymphoproliferative disease mimicking intestinal lymphoma: clinicopathologic features and follow-up in a unique case series. *Blood* vol. 117, n° 5, p. 1447-1452. [https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-302737]
- MARSHALL, J.S., WARRINGTON, R., WATSON, W., *et al.* (2018) An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* vol. 14, n° 2, p. 49. [https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1]
- MCDONOUGH, S.P., MOORE, P.F. (2000) Clinical, Hematologic, and Immunophenotypic Characterization of Canine Large Granular Lymphocytosis. *Veterinary Pathology* vol. 37, n° 6, p. 637-646. [https://doi.org/10.1354/vp.37-6-637]
- MICHAEL, H., ITO, D., MCCULLAR, V., *et al.* (2013a) Isolation and Characterization of Canine Natural Killer Cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 155, n° 3, p. 211. [https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.06.013]
- MICHAEL, H., ITO, D., MCCULLAR, V., *et al.* (2013b) Isolation and Characterization of Canine Natural Killer Cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 155, n° 3, p. 211-217. [https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.06.013]
- MIKULAK, J., BRUNI, E., ORIOLO, F., *et al.* (2019) Hepatic Natural Killer Cells: Organ-Specific Sentinels of Liver Immune Homeostasis and Physiopathology. *Frontiers in Immunology* vol. 10, [https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00946]
- MIN, K.Y., KOO, J., NOH, G., *et al.* (2022) CD1dhiPD-L1hiCD27+ Regulatory Natural Killer Subset Suppresses Atopic Dermatitis. *Frontiers in Immunology* vol. 12, [https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.752888]

- MIYAZATO, K., HAYAKAWA, Y. (2020) Pharmacological targeting of natural killer cells for cancer immunotherapy. *Cancer Science* vol. 111, n° 6, p. 1869-1875. [<https://doi.org/10.1111/cas.14418>]
- MÖBUS, L., RODRIGUEZ, E., HARDER, I., *et al.* (2021) Elevated NK-cell transcriptional signature and dysbalance of resting and activated NK cells in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 147, n° 5, p. 1959- 1965.e2. [<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.11.022>]
- MOIGNET, A., LAMY, T. (2018) Latest Advances in the Diagnosis and Treatment of Large Granular Lymphocytic Leukemia. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* n° 38, p. 616-625. [[https://doi.org/10.1200/EDBK\\_200689](https://doi.org/10.1200/EDBK_200689)]
- MORANDI, B., BOUGRAS, G., MULLER, W.A., *et al.* (2006) NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. *European Journal of Immunology* vol. 36, n° 9, p. 2394-2400. [<https://doi.org/10.1002/eji.200636290>]
- MORETTA, A., BOTTINO, C., VITALE, M., *et al.* (2001) Activating Receptors and Coreceptors Involved in Human Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis. *Annual Review of Immunology* vol. 19, n° 1, p. 197-223. [<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.197>]
- NAKAJIMA, M., SHIMODA, M., TAKEUCHI, K., *et al.* (2022) Lymphomatoid gastropathy/NK-cell enteropathy involving the stomach and intestine. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* vol. 62, n° 2, p. 114-118. [<https://doi.org/10.3960/jslrt.21032>]
- NAZARULLAH, A., DON, M., LINHARES, Y., *et al.* (2016) Aggressive NK-cell leukemia: A rare entity with diagnostic and therapeutic challenge. *Human Pathology: Case Reports* vol. 4, p. 32-37. [<https://doi.org/10.1016/j.ehpc.2015.08.001>]
- NERSESIAN, S., SCHWARTZ, S.L., GRANTHAM, S.R., *et al.* (2021) NK cell infiltration is associated with improved overall survival in solid cancers: A systematic review and meta-analysis. *Translational Oncology* vol. 14, n° 1, p. 100930. [<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100930>]
- NICHOLSON, L.B. (2016) The immune system. *Essays in Biochemistry* vol. 60, n° 3, p. 275-301. [<https://doi.org/10.1042/EBC20160017>]
- NOH, J.-Y., YOON, S.R., KIM, T.-D., *et al.* (2020) Toll-Like Receptors in Natural Killer Cells and Their Application for Immunotherapy. *Journal of Immunology Research* vol. 2020, p. 2045860. [<https://doi.org/10.1155/2020/2045860>]
- NOVELLI, F., CASANOVA, J.-L. (2004) The role of IL-12, IL-23 and IFN- $\gamma$  in immunity to viruses. *Cytokine & Growth Factor Reviews* vol. 15, n° 5, p. 367-377. [<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.009>]
- OCHAYON, D.E., DEVORE, S.B., CHANG, W.-C., *et al.* (2023) Progressive accumulation of hyperinflammatory NKG2Dlow NK cells in early life defines a novel endotype of severe atopic dermatitis. *MedRxiv*. [<https://doi.org/10.1101/2023.06.02.23290884>]
- OGBOMO, H., MODY, C.H. (2017) Granule-Dependent Natural Killer Cell Cytotoxicity to Fungal Pathogens. *Frontiers in Immunology* vol. 7, [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00692>]
- O'NEILL, M.A., HIDALGO, L.G. (2021) NK cells in antibody-mediated rejection – Key effector cells in microvascular graft damage. *International Journal of Immunogenetics* vol. 48, n° 2, p. 110-119. [<https://doi.org/10.1111/iji.12532>]

- OSUNA-ESPINOZA, K.Y., ROSAS-TARACO, A.G. (2023) Metabolism of NK cells during viral infections. *Frontiers in Immunology* vol. 14, [https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1064101]
- OTA, K., TANAKA, S. (2017) PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cells | Human | Cell Applications. [https://www.cellapplications.com/human-peripheral-blood-mononuclear-cells-pbmchmnc-pb] (consulté le 28/04/2023).
- PAANANEN, A., MIKKOLA, R., SARENEVA, T., *et al.* (2000) Inhibition of Human NK Cell Function by Valinomycin, a Toxin from *Streptomyces griseus* in Indoor Air. *Infection and Immunity* vol. 68, p. 165-9. [https://doi.org/10.1128/IAI.68.1.165-169.2000]
- PARHAM, P. (2004) NK Cells and Trophoblasts. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 200, n° 8, p. 951-955. [https://doi.org/10.1084/jem.20041783]
- PARK, J.-Y., SHIN, D.-J., LEE, S.-H., *et al.* (2015) The anti-canine distemper virus activities of ex vivo-expanded canine natural killer cells. *Veterinary Microbiology* vol. 176, n° 3, p. 239-249. [https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.021]
- PENG, Z., PANG, H., WU, H., *et al.* (2023) CCL2 promotes proliferation, migration and angiogenesis through the MAPK/ERK1/2/MMP9, PI3K/AKT, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in HUVECs. *Experimental and Therapeutic Medicine* vol. 25, n° 2, p. 1-9. [https://doi.org/10.3892/etm.2022.11776]
- PFLUG, N., LITTAUER, A., BEVERUNGEN, D., *et al.* (2022) Case Report: Large Granular Lymphocyte Leukemia (LGLL)—A Case Series of Challenging Presentations. *Frontiers in Oncology* vol. 11. [https://doi.org/10.3389/fonc.2021.775313]
- PONGPRUTTIPAN, T., KUMMALUE, T., BEDAVANIJA, A., *et al.* (2011) Aberrant antigenic expression in extranodal NK/T-cell lymphoma: a multi-parameter study from Thailand. *Diagnostic Pathology* vol. 6, p. 79. [https://doi.org/10.1186/1746-1596-6-79]
- PONTRELLI, P., RASCIO, F., CASTELLANO, G., *et al.* (2020) The Role of Natural Killer Cells in the Immune Response in Kidney Transplantation. *Frontiers in Immunology* vol. 11. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01454]
- QI, C., LIU, F., ZHANG, W., *et al.* (2022) Alzheimer's disease alters the transcriptomic profile of natural killer cells at single-cell resolution. *Frontiers in Immunology* vol. 13. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1004885]
- QI, C., LIU, Q. (2023) Natural killer cells in aging and age-related diseases. *Neurobiology of Disease* vol. 183, p. 106156. [https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106156]
- QUINTANILLA-MARTINEZ, L., SWERDLOW, S.H., TOUSSEYN, T., *et al.* (2023) New concepts in EBV-associated B, T, and NK cell lymphoproliferative disorders. *Virchows Archiv* vol. 482, n° 1, p. 227-244. [https://doi.org/10.1007/s00428-022-03414-4]
- R&D SYSTEMS (2017) Natural Killer Cell Markers. [https://www.rndsystems.com/resources/cell-markers/immune-cells/innate-lymphoid-cells/natural-killer-cell-markers] (consulté le 28/04/2023).

- RAHUL, E., NINGOMBAM, A., ACHARYA, S., *et al.* (2022) Large granular lymphocytic leukemia: a brief review. *American Journal of Blood Research* vol. 12, n° 1, p. 17-32.
- ROMEY, R., SCHNEIDER, S.E., LEONG, J.W., *et al.* (2012) Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* vol. 120, n° 24, p. 4751-4760. [<https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-419283>]
- SAGEDAL, S., HARTMANN, A., NORDAL, K.P., *et al.* (2004) Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney International* vol. 66, n° 1, p. 329-337. [<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00735.x>]
- SARGENT, I.L., BORZYCHOWSKI, A.M., REDMAN, C.W.G. (2006) NK cells and human pregnancy – an inflammatory view. *Trends in Immunology* vol. 27, n° 9, p. 399-404. [<https://doi.org/10.1016/j.it.2006.06.009>]
- SAXTON, R.A., TSUTSUMI, N., SU, L.L., *et al.* (2021) Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science* vol. 371, n° 6535, p. eabc8433. [<https://doi.org/10.1126/science.abc8433>]
- SCHMIDT, S., TRAMSEN, L., LEHRNBECHER, T. (2017) Natural Killer Cells in Antifungal Immunity. *Frontiers in Immunology* vol. 8, p. 1623. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01623>]
- SCHMIDT, S., ULLRICH, E., BOCHENNEK, K., *et al.* (2016) Role of natural killer cells in antibacterial immunity. *Expert Review of Hematology* vol. 9, n° 12, p. 1119-1127. [<https://doi.org/10.1080/17474086.2016.1254546>]
- 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* vol. 8. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00360>]
- SHI, F.-D., LJUNGGREN, H.-G., LA CAVA, A., *et al.* (2011) Organ-specific features of natural killer cells. *Nature Reviews. Immunology* vol. 11, n° 10, p. 658-671. [<https://doi.org/10.1038/nri3065>]
- SHIMODA, S., HISAMOTO, S., HARADA, K., *et al.* (2015) Natural killer cells regulate T cell immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* vol. 62, n° 6, p. 1817-1827. [<https://doi.org/10.1002/hep.28122>]
- SHMELEVA, E.V., COLUCCI, F. (2021) Maternal natural killer cells at the intersection between reproduction and mucosal immunity. *Mucosal Immunology* vol. 14, n° 5, p. 991-1005. [<https://doi.org/10.1038/s41385-020-00374-3>]
- SNEAD, E.C.R. (2007) Large granular intestinal lymphosarcoma and leukemia in a dog. *The Canadian Veterinary Journal* vol. 48, n° 8, p. 848-851.
- SOKOL, L., LOUGHRAN, T.P., Jr. (2006) Large Granular Lymphocyte Leukemia. *The Oncologist* vol. 11, n° 3, p. 263-273. [<https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-3-263>]
- SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F., ADIB-CONQUY, M., CAVAILLON, J.-M. (2012) Natural Killer (NK) Cells in Antibacterial Innate Immunity: Angels or Devils? *Molecular Medicine* vol. 18, n° 2, p. 270-285. [<https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00201>]

- SPITS, H., ARTIS, D., COLONNA, M., *et al.* (2013) Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology* vol. 13, n° 2, p. 145-149. [<https://doi.org/10.1038/nri3365>]
- SROKA-TOMASZEWSKA, J., TRZECIAK, M. (2021) Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22, n° 8, p. 4130. [<https://doi.org/10.3390/ijms22084130>]
- STRASSBURG, C.P., OBERMAYER-STRAUB, P., MANNS, M.P. (2000) Autoimmunity in liver diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* vol. 18, n° 2, p. 127-139. [<https://doi.org/10.1385/CRIAI:18:2:127>]
- SUN, C., XU, J., HUANG, Q., *et al.* (2017) High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. *Oncology* vol. 6, n° 1, p. e1264562. [<https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1264562>]
- TAKAHASHI, E., OHSHIMA, K., KIMURA, H., *et al.* (2011) Clinicopathological analysis of the age-related differences in patients with Epstein–Barr virus (EBV)-associated extranasal natural killer (NK)/T-cell lymphoma with reference to the relationship with aggressive NK cell leukaemia and chronic active EBV infection-associated lymphoproliferative disorders. *Histopathology* vol. 59, n° 4, p. 660-671. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03976.x>]
- TANG, Y.-T., WANG, D., LUO, H., *et al.* (2017) Aggressive NK-cell leukemia: clinical subtypes, molecular features, and treatment outcomes. *Blood Cancer Journal* vol. 7, n° 12, p. 1-5. [<https://doi.org/10.1038/s41408-017-0021-z>]
- TAVARES PEREIRA, M., NOWACZYK, R., PAYAN-CARREIRA, R., *et al.* (2021) Selected Uterine Immune Events Associated With the Establishment of Pregnancy in the Dog. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 7, p. 625921. [<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.625921>]
- THERESINE, M., PATIL, N.D., ZIMMER, J. (2020) Airway Natural Killer Cells and Bacteria in Health and Disease. *Frontiers in Immunology* vol. 11. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585048>]
- THIERY, J., KEEFE, D., BOULANT, S., *et al.* (2011) Perforin pores in the endosomal membrane trigger release of endocytosed granzyme B to the cytosol of target cells. *Nature Immunology* vol. 12, n° 8, p. 770-777. [<https://doi.org/10.1038/ni.2050>]
- TIAN, Z., CHEN, Y., GAO, B. (2013) Natural Killer Cells in Liver Disease. *Hepatology* vol. 57, n° 4, p. 1654. [<https://doi.org/10.1002/hep.26115>]
- TIZARD, I. (2018) *Veterinary Immunology*, 10th Edition. St Louis, Elsevier.
- TONG, C.Y.W., BAKRAN, A., PEIRIS, J.S.M., *et al.* (2002) The association of viral infection and chronic allograft nephropathy with graft dysfunction after renal transplantation. *Transplantation* vol. 74, n° 4, p. 576-578. [<https://doi.org/10.1097/00007890-200208270-00026>]
- TSUCHIYAMA, J., YOSHINO, T., MORI, M., *et al.* (1998) Characterization of a Novel Human Natural Killer-Cell Line (NK-YS) Established From Natural Killer Cell Lymphoma/Leukemia Associated With Epstein-Barr Virus Infection. *Blood* vol. 92, n° 4, p. 1374-1383. [<https://doi.org/10.1182/blood.V92.4.1374>]

- TURVEY, S.E., BROIDE, D.H. (2010) Innate immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 125, n° 2 Suppl 2, p. S24-32. [<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>]
- VALLI, V.E. (2007) *Veterinary Comparative hematology*. Ames, Blackwell Publishing.
- VAN ERP, E.A., VAN KAMPEN, M.R., VAN KASTEREN, P.B., *et al.* (2019) Viral Infection of Human Natural Killer Cells. *Viruses* vol. 11, n° 3, p. 243. [<https://doi.org/10.3390/v11030243>]
- VENTO-TORMO, R., EFREMOVA, M., BOTTING, R.A., *et al.* (2018) Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. *Nature* vol. 563, n° 7731, p. 347-353. [<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0698-6>]
- VILCHES, C., PARHAM, P. (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* vol. 20, p. 217-251. [<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942>]
- VITENSHEIN, A., CHARPAK-AMIKAM, Y., YAMIN, R., *et al.* (2016) NK Cell Recognition of *Candida glabrata* through Binding of NKp46 and NCR1 to Fungal Ligands Epa1, Epa6, and Epa7. *Cell Host & Microbe* vol. 20, n° 4, p. 527-534. [<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.008>]
- VIVIER, E., ARTIS, D., COLONNA, M., *et al.* (2018) Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* vol. 174, n° 5, p. 1054-1066. [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>]
- VIVIER, E., TOMASELLO, E., BARATIN, M., *et al.* (2008) Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* vol. 9, n° 5, p. 503-510. [<https://doi.org/10.1038/ni1582>]
- VOIGT, J., HÜNNIGER, K., BOUZANI, M., *et al.* (2014) Human Natural Killer Cells Acting as Phagocytes Against *Candida albicans* and Mounting an Inflammatory Response That Modulates Neutrophil Antifungal Activity. *The Journal of Infectious Diseases* vol. 209, n° 4, p. 616-626. [<https://doi.org/10.1093/infdis/jit574>]
- WALZER, T., DALOD, M., ROBBINS, S.H., *et al.* (2005) Natural-killer cells and dendritic cells: « l'union fait la force ». *Blood* vol. 106, n° 7, p. 2252-2258. [<https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1154>]
- WALZER, T., JAEGER, S., CHAIX, J., *et al.* (2007) Natural killer cells: from CD3–NKp46+ to post-genomics meta-analyses. *Current Opinion in Immunology* vol. 19, n° 3, p. 365-372. [<https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.04.004>]
- WANG, R., KARIAPPA, S., TOON, C.W., *et al.* (2019) NK-cell enteropathy, a potential diagnostic pitfall of intestinal lymphoproliferative disease. *Pathology* vol. 51, n° 3, p. 338-340. [<https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.09.064>]
- WHERRY, E.J. (2011) T cell exhaustion. *Nature Immunology* vol. 12, n° 6, p. 492-499. [<https://doi.org/10.1038/ni.2035>]
- WOLF, A.-S., SHERRATT, S., RILEY, E.M. (2017) NK Cells: Uncertain Allies against Malaria. *Frontiers in Immunology* vol. 8. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00212>]
- WOLF, N.K., KISSIOV, D.U., RAULET, D.H. (2023) Roles of natural killer cells in immunity to cancer, and applications to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* vol. 23, n° 2, p. 90-105. [<https://doi.org/10.1038/s41577-022-00732-1>]

- WU, L., KAER, L.V. (2011) Natural killer T cells in health and disease. *Frontiers in Bioscience-Scholar* vol. 3, n° 1, p. 236-251. [<https://doi.org/10.2741/S148>]
- XIA, D., MORGAN, E.A., BERGER, D., *et al.* (2019) NK-Cell Enteropathy and Similar Indolent Lymphoproliferative Disorders: A Case Series With Literature Review. *American Journal of Clinical Pathology* vol. 151, n° 1, p. 75-85. [<https://doi.org/10.1093/ajcp/aqy108>]
- XIANG, R.F., STACK, D., HUSTON, S.M., *et al.* (2016) Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate (Rac) and Src Family Kinases (SFK) Are Proximal and Essential for Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Activation in Natural Killer (NK) Cell-mediated Direct Cytotoxicity against *Cryptococcus neoformans*\*. *Journal of Biological Chemistry* vol. 291, n° 13, p. 6912-6922. [<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.681544>]
- XIAO, F., AI, G., YAN, W., *et al.* (2018) Intrahepatic recruitment of cytotoxic NK cells contributes to autoimmune hepatitis progression. *Cellular Immunology* vol. 327, p. 13-20. [<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.12.008>]
- XIE, M., LI, Y., MENG, Y.-Z., *et al.* (2022) Uterine Natural Killer Cells: A Rising Star in Human Pregnancy Regulation. *Frontiers in Immunology* vol. 13, p. 918550. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.918550>]
- YAMIN, R., BERHANI, O., PELEG, H., *et al.* (2019) High percentages and activity of synovial fluid NK cells present in patients with advanced stage active Rheumatoid Arthritis. *Scientific Reports* vol. 9, n° 1, p. 1351. [<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37448-z>]
- YANG, R., AI, Y., LIU, C., *et al.* (2022) Aggressive Natural Killer Cell Leukemia in an Adolescent Patient: A Case Report and Literature Review. *Frontiers in Pediatrics* vol. 10. [<https://doi.org/10.3389/fped.2022.829927>]
- YANG, Y., DAY, J., SOUZA-FONSECA GUIMARAES, F., *et al.* (2021) Natural killer cells in inflammatory autoimmune diseases. *Clinical & Translational Immunology* vol. 10, n° 2, p. e1250. [<https://doi.org/10.1002/cti2.1250>]
- YASUDA, N., MASUDA, K., TSUKUI, T., *et al.* (2009) Identification of canine natural CD3-positive T cells expressing an invariant T-cell receptor alpha chain. *Veterinary Immunology and Immunopathology* vol. 132, n° 2-4, p. 224-231. [<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.08.002>]
- ZAISS, D.M.W., GAUSE, W.C., OSBORNE, L.C., *et al.* (2015) Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation and tissue repair. *Immunity* vol. 42, n° 2, p. 216-226. [<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.020>]
- ZHANG, X., WEI, H. (2021) Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Frontiers in Immunology* vol. 12. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728291>]
- ZHANG, Y., FUNG, I.T.H., SANKAR, P., *et al.* (2020) Depletion of NK cells improves cognitive function in the Alzheimer's Disease mouse model. *Journal of Immunology* vol. 205, n° 2, p. 502-510. [<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000037>]

# RÔLES DES CELLULES NATURAL KILLER CANINES ET MISE AU POINT DE LEUR IDENTIFICATION PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX AU BIOPOLE ALFORT

---

**AUTEUR : Ruben CLODION**

## **RÉSUMÉ :**

Les cellules Natural Killer (NK) canines représentent des éléments clés de la réponse immunitaire innée au concept aujourd'hui débattu. Elles s'insèrent au sein de la classification des cellules lymphoïdes innées et contribuent à diverses immunités au sein de l'organisme ; leur valant un intérêt particulier dans le cadre de la mise en place de thérapies émergentes. Ces cellules sont en revanche impliquées dans certaines pathologies de l'organisme, allant du rejet de greffe à diverses maladies auto-immunes, voire des néoplasies des cellules NK. En l'absence d'anticorps disponibles pour suivre les marqueurs conventionnels dans l'espèce canine, la caractérisation précise de cette population cellulaire particulière reste à ce jour un enjeu important. La littérature récente à ce sujet en est la preuve et un consensus n'est pas encore clairement identifié sur le phénotype des cellules NK canines. Face à l'enjeu que représente l'identification des cellules NK, cette thèse a pour objet de tenter de les identifier à l'aide des anticorps disponibles au BioPôle Alfort (anti-CD3, anti-CD8 et anti-CD11b, avec une hypothèse de phénotype CD3-/CD8+/CD11b+ pour les cellules NK). Ces marquages ont été effectués sur des cellules mononucléées du sang périphérique, à partir d'échantillons canins disponibles au service d'immunologie du BioPôle Alfort. Les résultats obtenus indiquent près de 0,1 % en moyenne pour les cellules de phénotype CD3-/CD8+/CD11b+ et 8,3 % en moyenne pour les cellules CD3-/CD8+/CD11b-, sans influence de l'état de congélation des cellules, ni du sexe des animaux pour le phénotype CD3-/CD8+/CD11b+. Face à ces valeurs bien en deçà de l'estimation la plus basse disponible dans la littérature canine (2,5%, Gingrich *et al.*, 2019), des essais incluant d'autres anticorps ont été tentés (anti-CD5 et anti-NKp46 humains), avec une absence de marquage lors des essais réalisés. De plus, de nombreux échantillons provenaient de chiens atteints de processus néoplasiques dont des troubles lymphoprolifératifs, pouvant biaiser les résultats obtenus. Le marquage étant maintenant mis au point techniquement au service d'immunologie du BioPôle Alfort, d'autres travaux sur du sang issu de chiens sains, sont nécessaires à l'identification précise de la nature des cellules CD3-/CD8+/CD11b+ et CD3-/CD8+/CD11b- (analyse du transcriptome, tests de cytotoxicité, visualisation de la population en question entre autres), afin de pouvoir offrir dans un futur proche, une possibilité de phénotyper les cellules NK canines au cliniciens, lors de présentation de lymphome ou de leucémie, en plus des immunophénotypages classiquement proposés.

**MOTS CLÉS :** CYTOMÉTRIE DE FLUX, NATURAL KILLER, LYMPHOCYTE, LYMPHOME, IDENTIFICATION, CHIEN, BIOPOLE ALFORT

## **JURY :**

Président : Pr Grégory JOUVION

Directrice de thèse : Dr Delphine LE ROUX

Examineur : Dr Édouard REYES-GOMEZ

# **ROLES OF CANINE NATURAL KILLER CELLS AND DEVELOPMENT OF THEIR IDENTIFICATION BY FLOW CYTOMETRY AT BIOPOLE ALFORT**

---

**AUTHOR:** Ruben CLODION

## **SUMMARY:**

Canine Natural Killer (NK) cells are key components of the innate immune response, a concept that is currently debated. They fall under the classification of innate lymphoid cells and contribute to various immunities within the body (antiviral, antibacterial, antiparasitic, antitumor). These properties make them of particular interest in the development of emerging therapies. However, these cells are also implicated in some pathologies of the body, ranging from graft rejection to various autoimmune diseases and even NK cell neoplasms. In the absence of available antibodies for tracking conventional markers in the canine species, the precise characterization of this specific cell population remains an important challenge to this day. Recent literature on this topic serves as evidence, and a consensus has not yet been clearly identified regarding the phenotype of canine NK cells. Given the importance of identifying NK cells, this thesis aims to attempt their identification using antibodies available at BioPôle Alfort (anti-CD3, anti-CD8, and anti-CD11b, with a hypothesis of CD3-/CD8+/CD11b+ phenotype for NK cells). These markers were applied to peripheral blood mononuclear cells from canine samples available at the immunology department of BioPôle Alfort. The results obtained indicate an average of approximately 0.1% for the CD3-/CD8+/CD11b+ phenotype and an average of 8.3% for CD3-/CD8+/CD11b- cells, with no influence of cell freezing or the animals' sex on the CD3-CD8+CD11b+ phenotype. As these values are significantly lower than the lowest estimate available in canine literature (2.5%, Gingrich et al., 2019), further trials involving other antibodies were attempted (anti-CD5 and anti-human NKp46), with no labeling observed during the experiments. Moreover, many samples came from dogs with neoplastic processes, including lymphoproliferative disorders, which could bias the results obtained. Now that the labeling has been technically established at the immunology department of BioPôle Alfort, further work on blood from healthy dogs is necessary to precisely identify the nature of CD3-CD8+CD11b+ and CD3-CD8+CD11b- cells (transcriptome analysis, cytotoxicity tests, visualization of the population in question, among other analyses). This will potentially offer clinicians the ability to phenotype canine NK cells when presented with lymphoma or leukemia cases, in addition to the traditionally proposed immunophenotyping methods.

**KEYWORDS:** FLOW CYTOMETRY, NATURAL KILLER, LYMPHOCYTE, LYMPHOMA, DOG, ALFORT BIOPOLE

## **JURY:**

Chairperson: Pr Gregory JOUVION

Thesis Director: Dr Delphine LE ROUX

Reviewer: Dr Edouard REYES-GOMEZ