

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Le récepteur de l'IL-7 sur les cellules NK matures humaines : nature et fonction

Par

Annie Michaud

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de maîtrise en science

en microbiologie et immunologie

Avril 2008

©Annie Michaud, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé :  
Le récepteur de l'IL-7 sur les cellules NK matures humaines : nature et fonction

Présenté par :  
Annie Michaud

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr François Le Deist  
Présidente-rapporteuse

Dr Michel Duval  
Directeur de recherche

Dr Fernando Alvarez  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

Les cellules NK sont des lymphocytes capables d'exercer une cytolysse de certaines cellules tumorales. Dans le cadre de greffe de cellules souches hématopoïétiques contre les leucémies, cette activité des cellules NK devient intéressante. Afin de stimuler l'activité des cellules NK, les cytokines sont souvent utilisées. L'interleukine 7 (IL-7) est une cytokine actuellement testée en essais cliniques dans le cadre de greffe de moelle osseuse. Nous émettons l'hypothèse que l'IL-7 peut engendrer une activité cytotoxique des cellules NK, leur prolifération et leur production d'interféron gamma. Par cytométrie en flux, nous avons pu déterminer que les cellules NK humaines du sang expriment la chaîne alpha du récepteur de l'IL-7. Par cette même technique, nous avons également pu déterminer que l'IL-7 induit un état d'activation après 7 jours de culture sur des cellules NK non purifiées mais pas sur des cellules NK purifiées. Par un test de libération de chrome, nous avons également démontré que l'IL-7 induit une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK non purifiées et faiblement chez les cellules NK purifiées. Cette augmentation est variable d'un individu à l'autre. Un test de prolifération démontre que l'IL-7 induit une prolifération des cellules NK non purifiées mais pas des cellules NK purifiées. Un test d'apoptose a toutefois montré que l'IL-7 induit le maintien de la population de cellules NK purifiées. Finalement, nous avons démontré par un test ELISA que l'IL-7 n'induit qu'une faible production

d'interféron gamma. À travers chacun de ces tests, nous avons pu constater que l'IL-7 semblait avoir un effet sur la sous-population de cellules NK CD56<sup>bright</sup> seulement. Donc, l'IL-7 n'a pas d'effet direct d'activation sur les cellules NK mais n'induit pas non plus l'apoptose. Dans le cadre de thérapie post greffe, l'IL-7 pourrait être considéré comme agent stimulant les cellules lymphoïdes sans impact majeur sur les cellules NK.

Mots clés : cellule NK, IL-7, CD127, cytotoxicité, prolifération

## ABSTRACT

NK cells are lymphocytes able to exert cytolyse of specific tumors cells. In hematopoietic stem cells transplant, this ability becomes interesting. To stimulate NK cells activity, cytokines are frequently used. Interleukin 7 (IL-7) is a cytokine actually tested in clinical assays involving hematopoietic stem cells transplant. We hypothesis that IL-7 can induce NK cells cytotoxic activity, NK cells proliferation and NK cells interferon gamma production. With flow cytometry, we have determined that peripheral human NK cells express IL-7 receptor alpha chain. We also have determined with flow cytometry the activated state induced by IL-7 after 7 days of culture of not purified NK cells but not on purified NK cells. By chromium release assay, we also have demonstrated the enhancement of cytotoxic activity of not purified NK cells the lower enhancement of the cytotoxic activity of purified NK cells induced by IL-7. This enhancement is inconsistent between individual. Our proliferation assays showed IL-7 induction in CD56<sup>bright</sup> not purified NK cells but no in purified NK cells. Apoptosis assay showed the maintenance of purified NK cells population induced by IL-7. Across these several assays, we noticed the effect of IL-7 on CD56<sup>bright</sup> NK cells only. Therefore, IL-7 doesn't have any effect on NK cells activation but doesn't either induce apoptosis. In post hematopoietic stem cells graft therapy, IL-7 could be considered as lymphoid stimulated agent without major impact on NK cells.

**Key words : NK cells, IL-7, CD127, cytotoxicity, proliferation, activation**

## Table des matières

RÉSUMÉ FRANÇAIS .....	I
ABSTRACT .....	III
TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES FIGURES .....	IX
LISTE DES TABLEAUX .....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XII
REMERCIEMENTS .....	XIV
Avant-propos .....	1
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Cellules NK .....</b>	<b>5</b>
1.1.1. Ontogénie .....	7
1.1.1.1. Précurseurs des cellules NK (NKPs) .....	7
1.1.1.2. Cellules NK immatures .....	8
1.1.1.3. Cellules NK matures .....	11
1.1.2. Marqueurs d'activation .....	13
1.1.3. Récepteurs .....	16
1.1.3.1. KIR .....	16
1.1.3.2. NKG2 .....	17
1.1.3.3. NCR .....	19
1.1.4. Le soi manquant .....	19
1.1.5. Fonctions .....	21
1.1.5.1. Cytotoxicités .....	21
1.1.5.1.1. Cytotoxicité naturelle .....	24



1.1.5.1.2.	Effet LAK .....	24
1.1.5.1.3.	ADCC .....	26
1.1.5.2.	Production de cytokines .....	26
1.1.6.	Cellules NK et immunité antivirale .....	29
1.1.7.	Cellules NK et immunité antitumorale .....	30
1.1.7.1.	Activité .....	30
1.1.7.2.	IFN- $\gamma$ .....	31
1.1.8.	Histocompatibilité réduite de cellules NK greffées .....	31
<b>1.2.</b>	<b>Interleukine 7 .....</b>	<b>32</b>
1.2.1.	Définition .....	32
1.2.2.	Récepteur .....	33
1.2.3.	Rôle de l'IL-7 dans l'hématopoïèse .....	36
1.2.4.	IL-7 et greffe de cellules souches hématopoïétiques .....	39
<b>2.</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1.</b>	<b>Préparation des cellules NK .....</b>	<b>41</b>
2.1.1.	Collecte des échantillons .....	41
2.1.2.	Isolation des cellules mononuclées du sang .....	41
2.1.3.	Purification des cellules NK .....	42
2.1.4.	Culture cellulaire .....	43
<b>2.2.</b>	<b>Phénotypage par cytométrie en flux .....</b>	<b>43</b>
2.2.1.	Marquage de base .....	43
2.2.2.	IFN- $\alpha$ .....	44
2.2.3.	Prolifération .....	45
2.2.4.	Mort cellulaire .....	46

2.3. Largage de chrome .....	47
2.4. Production d'IFN- $\gamma$ .....	48
<b>3. RÉSULTATS .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Récepteur de l'IL-7 .....</b>	<b>50</b>
3.1.1. Expression de CD127 .....	50
<b>3.2. Effets de l'IL-7 sur les cellules NK non purifiées .....</b>	<b>54</b>
3.2.1. Phénotype .....	54
3.2.1.1. Optimisation .....	54
3.2.1.1.1. Concentration d'IL-7 .....	54
3.2.1.1.2. Temps d'incubation .....	56
3.2.1.2. Marqueurs d'activation et récepteurs .....	58
3.2.2. Fonction .....	60
3.2.2.1. Optimisation .....	60
3.2.2.2. Cytotoxicité induite .....	60
3.2.3. Prolifération .....	62
<b>3.3. Effets de l'IL-7 sur des cellules NK purifiées .....</b>	<b>64</b>
3.3.1. Phénotype .....	64
3.3.2. Fonction .....	66
3.3.3. Prolifération .....	68
3.3.4. Apoptose .....	70
3.3.5. Production d'IFN- $\gamma$ .....	72
<b>3.4. Effets de l'IL-7 sur les sous-populations de cellules NK .....</b>	<b>73</b>
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>75</b>

<b>4.1. Le récepteur de l'IL-7 .....</b>	<b>76</b>
4.1.1. Expression de CD127 .....	76
4.1.1.1. Cellules NK thymiques .....	76
4.1.1.2. Expression de CD127 sur les cellules NK CD56 <sup>bright</sup> .....	77
4.1.2. Polymorphisme .....	78
4.1.3. Affinité .....	79
<b>4.2. IL-7 et fonction des cellules NK .....</b>	<b>80</b>
4.2.1. Activité cytotoxique .....	80
4.2.2. Production d'IFN- $\gamma$ .....	83
4.2.3. Prolifération .....	84
4.2.4. Survie .....	85
4.2.5. Synergie .....	86
4.2.6. Rôle dans la maturation .....	87
<b>5. CONCLUSION .....</b>	<b>89</b>
<b>6. RÉFÉRENCES .....</b>	<b>90</b>

## Listes des figures

### *Introduction*

Figure 1 : Cellule NK	6
Figure 2 ; Ontogénie des cellules NK de l'Homme	10
Figure 3 : Récepteurs de l'IL-15 et de l'IL-2	15
Figure 4 : Récepteurs KIR et NKG2 et leurs ligands	18
Figure 5 : Régulation de la réponse des cellules NK par les récepteurs d'activation ou d'inhibition	20
Figure 6 : Polarisation des granules suite à l'adhésion des cellules	22
Figure 7 : Cytolyse par une cellule NK	25
Figure 8 : Sous-populations des cellules NK	28
Figure 9 : Récepteur de l'IL-7	35
Figure 10 : Expression de CD127 sur les lignées lymphoïdes	38

### *Résultats*

Figure 1 : Expression de CD127 sur des cellules NK	53
Figure 2 : Influence de la concentration d'IL-7 sur les cellules NK	55
Figure 3 : Effet de l'IL-7 à court et moyen terme	57
Figure 4 : Phénotype des cellules NK après 7 jours de culture	59
Figure 5 : Cytotoxicité induite par l'IL-7	61
Figure 6 : Induction par l'IL-7 d'une prolifération des cellules NK	63
Figure 7 : Phénotype des cellules NK purifiées après 7 jours de culture	65
Figure 8 : Cytotoxicité induite par l'IL-7 sur des cellules NK purifiées en culture pendant 72 heures	67

Figure 9 : Induction par l'IL-7 de la prolifération des cellules NK purifiées 69

Figure 10 : Expression des marqueurs d'apoptose et de nécrose chez de cellules NK 71

## Liste des tableaux

### *Résultats*

Tableau I : Production d'IFN- $\gamma$ (pg/mL) induite par l'IL-7	72
Tableau II : Effet de l'IL-7 sur le nombre de cellules NK parmi des PBMC	74
Tableau III : Effet de l'IL-7 sur le nombre de cellules NK purifiées	74

## Liste des abréviations

CHS : cellule souche hématopoïétique

NK : *natural killer*

Ag : antigène

APC : *antigen-presenting cells*, cellule présentatrice d'antigènes

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

GVHD : *graft versus host disease*, maladie du greffon contre l'hôte

GVL : *graft versus leukemia*, réaction du greffon contre la leucémie

IL : interleukine

IFN : interféron

NKP : précurseur de cellules NK

ID : inhibiteur de liaison à l'ADN

iNK : cellule NK immature

NKR-P1 : récepteur protéinique 1 des cellules NK de type C-lectine (CD161)

KIR : récepteur d'immunoglobuline engendrant une activité tueuse

NCR : récepteurs de cytotoxicité naturelle

LAK : *human lymphokine activated killer* (activité cytolytique induite par des lymphokines)

ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, immunorécepteur activateur à base tyrosine

ITIM : *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, immunorécepteur inhibiteur à base tyrosine

PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate

Grz : granzyme

CD25 : chaîne alpha du récepteur de l'IL-2

ADCC : *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, cytotoxicité dépendante d'une stimulation par des anticorps

GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, facteur de stimulation de la formation de colonie des macrophages et des granulocytes

TNF : *tumor necrosis factor*, facteur de nécrose tumorale

CLP : progéniteur de cellules lymphoïdes communes

IRE : *Interferon response element*, élément répondant à l'interferon

PBMC : *peripheral blood mononucleated cells*, cellules mononucléées du sang

PBS : *phosphate buffered saline*, tampon de phosphate salin

FBS : sérum fœtal bovin

BSA : albumine de serum bovin

EDTA : l'acide éthylène-diamine-tétraacétique

PS : phosphatidylsérine

pDC : cellule dendritique plasmacytoïde



## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche le Dr Michel Duval pour m'avoir donné l'opportunité d'accomplir mon travail de maîtrise dans son laboratoire. J'aimerais ajouter à Michel toute l'équipe de recherche du laboratoire, R'Kia, Paulo et Emily. Merci de m'avoir transmise une partie de votre savoir, de m'avoir aidée et supportée dans mon apprentissage, de toujours m'avoir judicieusement conseillée, et d'avoir fait de moi une meilleure scientifique.

Merci infiniment à ma famille Mireille, Clément et Éric pour avoir toujours cru en moi. Vous m'avez toujours donné tout ce que j'avais besoin pour réussir. J'aimerais finalement remercier ma douce moitié Nicola qui depuis le début m'a encouragée, supportée, corrigée et a fait de moi une meilleure rédactrice. Merci de partager ma vie.

*When once your point of view is changed,  
the very thing which was damning  
becomes a clue to the truth.*

Sherlock Holmes

## Avant-propos

Depuis les années 50, la transplantation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) est utilisée dans le traitement des maladies affectant le système hématopoïétique. Ces maladies sont aussi diverses que potentiellement mortelles sans intervention médicale. Notons parmi elles les leucémies, les anémies, la maladie de Hodgkin, les syndromes myélodysplasiques et les désordres myéloprolifératifs. Actuellement, on collecte les CSH à partir de la moelle osseuse, du sang périphérique ou du sang de cordon. La procédure de greffe est relativement simple puisqu'une fois que les CSH sont récoltées, il suffit d'effectuer une transfusion de ces cellules au patient. Toutefois, comme il s'agit majoritairement de greffons provenant d'individus non identiques aux receveurs, on est confronté au phénomène de rejet de la greffe. Ce phénomène est dû à deux types de lymphocytes, soient les lymphocytes T, principalement les CD8<sup>+</sup>, et les cellules *natural killer* (NK). Ces deux types de lymphocytes effectuent une cytolysse des cellules du greffon, mais leur manière de reconnaître ces dernières comme étant du non soi diffère. Les lymphocytes T reconnaissent les cellules du greffon via des antigènes (Ag) spécifiques présents à la surface des cellules. Dans le cas des cellules du greffon, ces Ag sont différents de ceux de l'hôte et ils finissent par être présentés par des cellules spécialisées (APC) ce qui active les lymphocytes T. Les lymphocytes T activés sécrètent des cytokines qui activent à leur tour d'autres

lymphocytes T (Shlomchik *et al*, 1999). Ainsi, une réaction de plus en plus importante est engendrée contre les cellules du greffon.

Cependant, contrairement aux greffes d'organes solides, le rejet des greffes hématopoïétiques peut être contrôlé par la destruction complète des cellules T du receveur avant la greffe. Cette destruction est obtenue par des chimiothérapies ou par l'association chimiothérapie-radiothérapie. Ces traitements ont pour triple but la destruction des cellules souches du receveur (pour faire la place pour les cellules-souches du donneur), la destruction des lymphocytes du donneur (pour éviter le rejet) et la destruction des cellules leucémiques (quand la greffe est réalisée pour traiter une maladie maligne).

Si le rejet de greffe peut être contourné dans la greffe de CSH, ce type de transplantation amène tout de même une forme de rejet : la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Dans ce cas, le phénomène de reconnaissance du non soi par les lymphocytes se retourne contre l'hôte. Une solution partielle à ce problème a été d'éliminer les lymphocytes T du greffon avant de l'infuser au patient ; cela peut être réalisé soit par destruction des cellules T, soit par sélection d'une population CD34+ (auquel cas le greffon est également déplété en cellules NK et en cellules B). De leur côté, les cellules NK effectuent une cytolyse lorsque les cellules qu'elles rencontrent ne présentent pas les mêmes molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou expriment une plus grande quantité de récepteurs activateurs que la normale (Lanier, 2005). Concernant l'action des cellules NK, une

étude chez la souris montre que les cellules NK du greffon reconnaissant des CMH différents de ceux exprimés par l'hôte (phénomène d'histocompatibilité réduite) n'induisent pas de GVHD. De plus, si elles sont purifiées puis injectées à l'hôte, elles effectuent la cytolysse des APC, ce qui empêche l'initiation de l'activation des lymphocytes T. Ainsi, le reste du greffon peut être injecté avec les lymphocytes T sans qu'une GVHD se déclare (Ruggeri *et al*, 2002). Cette hypothèse reste toutefois à être démontrée chez l'Homme.

Enfin, les cellules NK sont reconnues comme ayant un effet antitumoral (Wolfe *et al*, 1976). Les cellules NK du greffon et par la suite celles issues de la reconstitution immunitaire ont donc également un effet contre les cellules leucémiques (GVL). Les cellules NK auraient donc un double effet : un effet anti GVHD et un effet GVL.

Les cellules NK permettraient donc de dissocier GVHD et GVL. Comme chez l'Homme la quantité de cellules transfusées est critique et limitée, il est difficile de purifier les cellules NK à partir du greffon. Nous croyons qu'en stimulant celles-ci post greffe, il serait possible d'augmenter leur nombre et leur efficacité contre les cellules leucémiques résiduelles.

Plusieurs cytokines ont montré leur grande efficacité pour activer et faire proliférer les cellules NK. Parmi les cytokines stimulant les cellules NK, on note les interférons (IFN), l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21 (Colucci *et al*, 2003; Trinchieri & Santoli, 1978; Santoli *et*

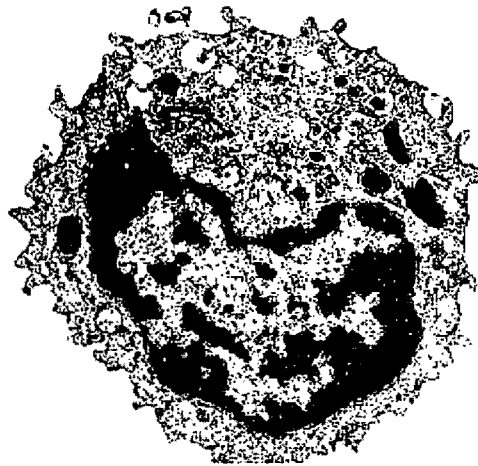
*al*, 1978). Les trois dernières cytokines mentionnées appartiennent à une même famille de cytokines dont les récepteurs contiennent la chaîne  $\gamma_c$ .

Parmi les cytokines dont le récepteur contient la chaîne  $\gamma_c$  se trouve également l'IL-7. Son effet sur les cellules NK est peu connu et controversé. Nous savons toutefois qu'elle constitue une interleukine importante de la lymphopoïèse et ceci la rend donc intéressante dans le cadre de la reconstitution immunitaire suite à une greffe de CSH (Namen *et al*, 1988) (Murray *et al*, 1989). Ayant démontré que les cellules NK expriment le récepteur de l'IL-7, nous proposons l'hypothèse que l'IL-7 pourrait augmenter l'effet GVL des cellules NK. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué l'activation, la prolifération ainsi que le phénotype des cellules NK induits par l'IL-7.

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Les cellules NK

Les cellules NK sont des lymphocytes agissant au niveau de l'immunité innée. Leur effet principal est leur activité cytotoxique dirigée contre des cellules infectées par des virus et contre des cellules cancéreuses. Elles ont d'abord été décrites comme étant de petits lymphocytes de nature indéfinie et ne répondant pas à une induction ou une précipitation par les anticorps (Kiessling *et al*, 1975). À cette époque, afin de traiter des tumeurs, on introduisait des bacilles de Calmette-Guérin dans les plaies. Cette action amenait une réaction cytotoxique contre les tumeurs. Suite aux observations de Kiessling, les chercheurs ont réalisé que le phénomène observé était en fait dû à l'action des cellules NK. Depuis, nos connaissances sur cette cellule immunitaire se sont beaucoup approfondies. On définit les cellules NK comme des cellules portant la molécule de surface CD56, en l'absence de la molécule CD3. L'aspect morphologique des cellules NK est celui de gros lymphocyte granuleux.



**Figure 1 : Cellule NK.** Figure emprunté de l'Institut national de recherche pédagogique, MET x 8 800, France ([www.inrp.fr](http://www.inrp.fr))



### 1.1.1. Ontogénie

Après une hypothèse initiale voulant que les cellules NK apparaissent spontanément au niveau de la rate, on a rapidement montré la nécessité d'une moelle osseuse fonctionnelle pour retrouver des cellules NK matures dans les organes lymphoïdes et en périphérie (Haller & Wigzell, 1977). Ainsi, les cellules NK dérivent des CSH. Toutefois, dans la moelle osseuse, on retrouve essentiellement des précurseurs de cellules NK (NKP) et peu de cellules NK matures (Colucci *et al*, 2003). Les connaissances sur le cheminement des NKP au cours de leur maturation restent malheureusement incomplètes. Nous pouvons croire que ni le thymus ni la rate ne semblent jouer un rôle majeur dans la genèse des cellules NK puisque des patients n'ayant pas ou plus de thymus ou de rate ont une population normale (Sirianni *et al*, 1983; Ramos *et al*, 1996; Passlick *et al*, 1991).

Bien que nous ne sachions pas tout du développement des cellules NK, nous pouvons facilement identifier trois stades de développement : les NKP, les cellules NK immatures (iNK) et les cellules NK matures.

#### 1.1.1.1. Précurseurs des cellules NK (NKP)

Les CSH se différencient premièrement en progéniteurs communs de lignées myéloïde et lymphoïde (Akashi *et al*, 2000; Kondo *et al*, 1997). Nous savons que les précurseurs lymphoïdes donnent naissance aux précurseurs précoces des lignées

lymphoïdes qui donneront eux naissance aux précurseurs de lymphocytes B et T (Igarashi *et al*, 2002). Toutefois, on doit pour l'instant assumer que les précurseurs précoces de lignées lymphoïdes donneront également naissance aux NKP puisqu'aucune évidence directe vient vérifier cette supposition. Des tests *in vitro* ont montré qu'en mettant en culture des CSH avec des facteurs de cellules souches (c-KIT ligand, FLK2 (FL3TL3) et IL-7), on obtenait des cellules exprimant la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-2, qui en théorie pourraient être les NKP (Mrózek *et al*, 1996; Williams *et al*, 1997). Si on a pu confirmer ces observations *in vivo* chez la souris, ce n'est toujours pas le cas chez l'Homme (Rosmaraki *et al*, 2001).

#### 1.1.1.2. Cellules NK immatures

Graduellement, le phénotype des cellules NKP se précisera et on verra apparaître les cellules NK immatures (iNK). Nous pouvons affirmer qu'une cellule NKP est devenue iNK lorsqu'apparaît le récepteur protéinique 1 des cellules NK de type C-lectine (NKR-P1) aussi appelé CD161. La période de maturation des cellules iNK leur permet d'acquérir le phénotype nécessaire au bon fonctionnement de leur activité immunologique. Elles doivent donc se munir de tous leurs récepteurs, inhibiteurs comme activateurs, ainsi que des molécules d'activation exprimées à leur surface leur permettant d'exercer une activité cytotoxique. La forme la plus immature des cellules NK exprime CD161. Puis, elles acquièrent CD56 et finalement CD94, CD16,

les KIR et les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) (figure 2) (Bennett *et al*, 1996;Sivori *et al*, 2002;Yu *et al*, 1998).

Les iNK sont caractérisées par leur incapacité à effectuer une lyse via la perforine ainsi qu'à produire de l'IFN- $\gamma$ . Toutefois, une activité cytotoxique peut être induite par l'IL-15 (Rosmaraki *et al*, 2001), probablement parce que cette cytokine induit une maturation des iNK. Afin d'acquérir une maturité, les cellules iNK doivent être stimulées. Bien que l'IL-2 puisse engendrer cette maturation, elle n'est pourtant pas essentielle à cette dernière (Sharfe *et al*, 1997;Colucci *et al*, 2003). Par contre, une anomalie quelconque au niveau du récepteur de l'IL-15 induit une réduction majeure du nombre de cellules NK (Gilmour *et al*, 2001). Finalement, des évidences *in vitro* nous laissent croire que le contact des cellules iNK avec des cellules stromales est essentiel pour l'élaboration d'un répertoire de récepteurs de type immunoglobuline engendrant une activité tueuse (KIR) (Miller & McCullar, 2001).

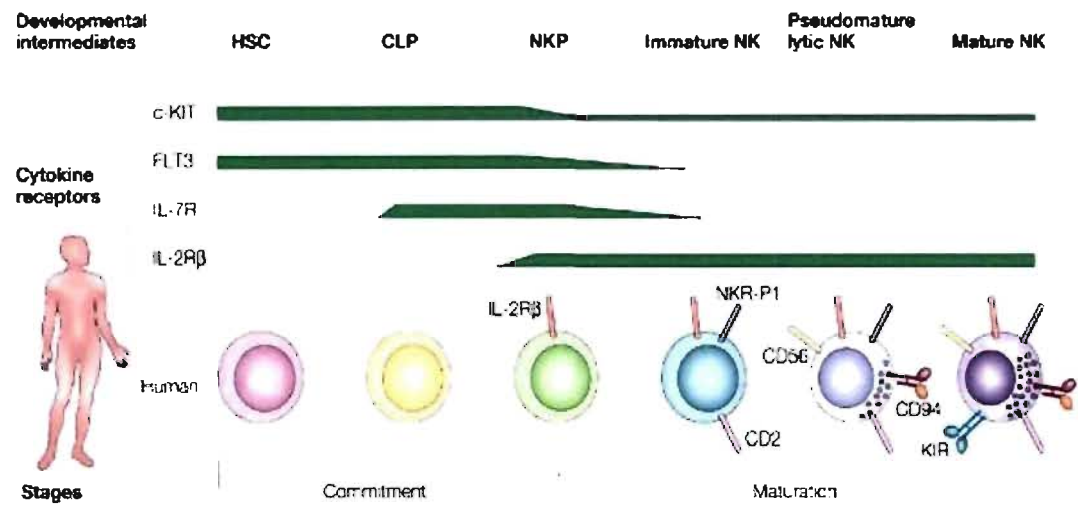


Figure 2 : Ontogénies des cellules NK de l'Homme. (Colucci *et al*, 2003).

### 1.1.1.3. Cellules NK matures

Selon la fonction et la nature des cellules, différents antigènes sont présents à leur surface. Ces antigènes peuvent avoir des rôles divers dans la fonction des cellules et peuvent devenir des marqueurs permettant d'identifier des populations. CD56 permet la différenciation des cellules NK par rapport aux autres lymphocytes. CD56 est un isomère d'une glycoprotéine du cerveau ayant comme rôle l'adhésion des cellules. Nous ne connaissons cependant pas le rôle de CD56 au niveau des cellules NK (Lanier *et al*, 1986; Lanier *et al*, 1989; Lanier *et al*, 1991). D'autres lymphocytes, les cellules NKT, expriment cette molécule, et c'est pourquoi nous devons identifier les cellules NK comme étant CD56 positives mais aussi CD3 négatives. CD3 est une molécule faisant partie du complexe du récepteur des lymphocytes T, et est présente également chez les cellules NKT.

Nous ne pouvons pas décrire la maturation des cellules NK sans discuter de la diversité à l'intérieur même des populations de cellules NK. En effet, les cellules NK matures peuvent se subdiviser en deux sous-populations distinctes. La première est caractérisée par une faible expression de CD56 et l'expression du récepteur FcγRIII (CD16) et, de ce fait, est capable de générer une activité cytotoxique après son activation par des anticorps. Elle représente 90% de la population totale de cellules NK du sang. On la nomme CD56<sup>dim</sup> (Parrish-Novak *et al*, 2000). La seconde sous-population est caractérisée par une plus forte expression de CD56, d'où son appellation CD56<sup>bright</sup>, et est reconnue pour sécréter plusieurs types de cytokines

(Cooper *et al*, 2001b). Actuellement, aucune donnée *in vivo* ne nous permet de comprendre comment cette différenciation s'effectue. Toutefois, une théorie vieille de nombreuses années veut que la sous-population de cellules NK CD56<sup>bright</sup> n'ait pas complètement terminé son processus de maturation. Ce processus ne serait complété que lorsqu'elles acquerraient le phénotype des cellules CD56<sup>dim</sup>. Jusqu'à ce jour, plusieurs recherches ont apporté des arguments pour ou contre cette théorie. Parmi les arguments favorables, notons la capacité des cellules NK CD56<sup>bright</sup> à proliférer, contrairement aux cellules CD56<sup>dim</sup> (Lanier *et al*, 1986; Cooper *et al*, 2001b). Une autre étude suggère que les cellules NK CD56<sup>bright</sup> sont moins différenciées que les CD56<sup>dim</sup>, sans toutefois préciser le facteur qui serait responsable de la maturation des CD56<sup>bright</sup> vers les CD56<sup>dim</sup> (Mrózek *et al*, 1996). Il a également été suggéré que le stade de maturation pouvait être associé à un profil de sécrétion de cytokines spécifiques (Loza *et al*, 2002). Finalement, il a récemment été montré que lorsque mise en contact avec des fibroblastes, la sous-population de cellules NK CD56<sup>bright</sup> se différencie en cellules NK CD56<sup>dim</sup> (Chan *et al*, 2007).

Des arguments ont été avancés contredisant la théorie des cellules CD56<sup>bright</sup> précurseur des CD56<sup>dim</sup>. Notons les résultats d'une étude démontrant que des cellules NK CD56+ en culture peuvent acquérir un profil de sécrétion de cytokines mixte, soit de type I (stimulant la voie Th1) et de type II (stimulant la voie Th2), lorsque les cellules sont stimulées de manière appropriée (Peritt *et al*, 1998; Hoshino *et al*, 1999). Une publication ultérieure a démontré que des clones de

cellules NK CD56<sup>+</sup> avaient été décrits comme pouvant chacun posséder des profils de sécrétion de cytokines distincts (Loza & Perussia, 2001). Ainsi, ce débat est encore ouvert. De plus, comme chez la souris on ne retrouve pas cette subdivision de cellules NK, le mystère pourrait persister longtemps (Colucci *et al*, 2003).

On retrouve les cellules NK matures dans différents systèmes du corps humains et la proportion des deux sous-populations diffèrent d'un système à l'autre. On retrouve en périphérie 90% de CD56<sup>dim</sup> et 10% de CD56<sup>bright</sup> alors que dans les ganglions, on retrouve 10% de CD56<sup>dim</sup> et 90% de CD56<sup>bright</sup>. On retrouve également des cellules NK CD56<sup>bright</sup> dans la face maternelle du placenta (Croy *et al*, 2002). Toutefois, il a été démontré dans notre laboratoire que le sang de cordon (sang placentaire du nouveau né) ne comporte pas davantage de cellules NK CD56<sup>bright</sup> que le sang d'adulte (Dalle *et al*, 2005). Les cellules NK ont comme rôle de contrôler les cellules qu'elles croisent afin de repérer celles qui ont été transformées par un virus ou par une activité tumorale (Cooper *et al*, 2001b; Fehniger *et al*, 2003). La durée de vie des ces cellules NK matures est d'au moins cinq semaines.

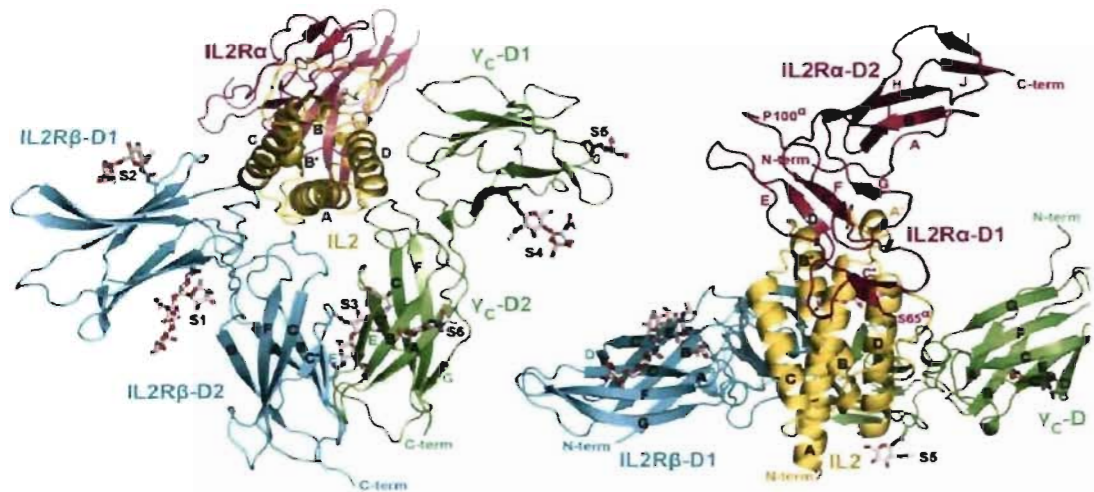
### **1.1.2. Marqueurs d'activation**

Lorsque les cellules NK rencontrent différentes cytokines, ces dernières peuvent activer les cellules NK. Chez les cellules NK, on retrouve trois molécules induites par l'effet d'activation et reconnues comme étant des marqueurs classiques

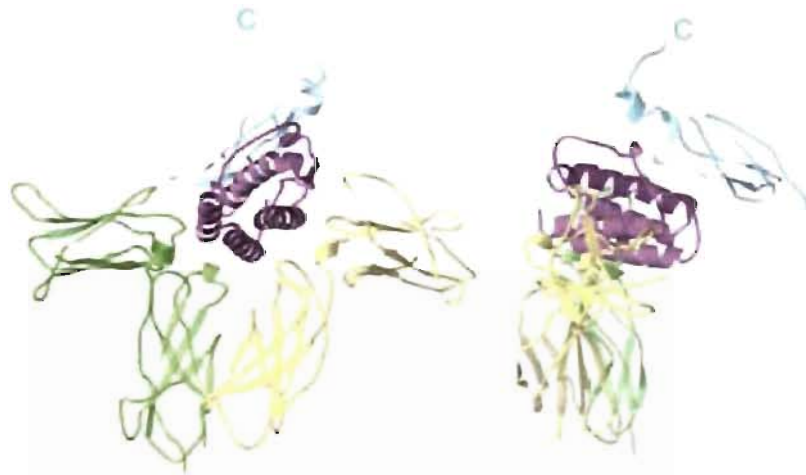
d'activation. La chaîne  $\alpha$  (CD25) du récepteur de l'IL-2 en est une (Lanier *et al*, 1988). Une deuxième molécule d'activation est CD69. Chez les lymphocytes T et en présence d'agents stimulants, CD69 peut induire l'expression de CD25 (Testi *et al*, 1989). Finalement, une troisième molécule, CD45, peut être considérée comme étant un marqueur d'activation. CD45 est une glycoprotéine phosphatase induisant l'activation des cellules NK. Malgré qu'elle possède la forme d'un récepteur, aucun ligand ne lui a été trouvé jusqu'aujourd'hui (Hermiston *et al*, 2003). On retrouve deux isoformes : un petit nommé RO et un plus gros nommé RA. Ce dernier est retrouvé chez les cellules NK matures non activées, alors que l'isoforme RO est retrouvé chez les cellules NK activées. On connaît surtout le rôle de CD45 chez les lymphocytes B et T. Suite à la stimulation, l'isoforme RA augmente rapidement, pour ensuite faire place à l'isoforme RO après environ trois jours de stimulation (Deans *et al*, 1989). De plus, il a été montré que CD45 pourrait réguler négativement l'activation des récepteurs de cytokines et d'IFN via la déphosphorylation des JAKs (Irie-Sasaki *et al*, 2001).

Plusieurs cytokines peuvent engendrer l'activation des cellules NK. Ces cytokines sont les IFN (Trinchieri & Santoli, 1978; Santoli *et al*, 1978), l'IL-2 (Henney *et al*, 1981), l'IL-15 (Carson *et al*, 1994), l'IL-18 (Cooper *et al*, 2001b) et l'IL-21 (Parrish-Novak *et al*, 2000). Ces différentes cytokines induisent un phénotype d'activation et en général augmentent l'expression de récepteurs activateurs.





**A**



**B**

**Figure 3 : Récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15.** **A** Cristallographie du récepteur de l'IL-2. On observe facilement les trois chaînes  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  et  $\gamma_c$  du récepteur respectivement en magenta, bleu et vert ainsi que l'IL-2 en jaune (Stauber *et al*, 2006). **B** Cristallographie du récepteur de l'IL-15 sous deux angles différents. On observe facilement les deux chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma_c$  du récepteur respectivement en vert, bleu et jaune. l'IL-15 est représenté en magenta(Chirifu *et al*, 2007).

### 1.1.3. Récepteurs

Comme les cellules NK ne reconnaissent pas spécifiquement l'antigène, leur mode d'activation consiste en une balance de signaux d'activation et de signaux d'inhibition. De ce fait, les cellules NK possèdent plusieurs récepteurs activateurs et/ou inhibiteurs (Bottino *et al*, 2000).

#### 1.1.3.1. KIR

Une classe de récepteurs appartient à la superfamille des immunoglobulines mais ont une activité tueuse (KIR). Les récepteurs KIR sont exprimés majoritairement sur la sous-population de cellule NK CD56<sup>dim</sup> (Jacobs *et al*, 2001). Les récepteurs KIR peuvent avoir deux ou trois domaines extracellulaires et les domaines intracellulaires peuvent être longs ou courts. Pour cette raison, les KIR ayant deux domaines longs sont nommés KIR2DL et les KIR ayant deux domaines courts KIR2DS. Il en va de même pour les KIR ayant trois domaines. Il existe également une spécificité à l'intérieur de chacun des ces types de récepteurs. On ajoute alors un chiffre à la fin de la nomination afin de marquer cette spécificité (KIR2DL1). Les KIR reconnaissent les molécules HLA de class I. Les KIR2D reconnaissent HLA-C, alors que les KIR3D reconnaissent les HLA-B et HLA-A (Fan & Wiley, 1999) (Gumperz *et al*, 1995). Les récepteurs KIR peuvent avoir une action inhibitrice, comme KIR2DL1, ou activatrice comme KIR3DL1 (Litwin *et al*, 1994) (Frohn *et al*, 1997). Comme pour la

majorité des récepteurs activateurs ou inhibiteurs, ce qui différencie le signal transmis est la présence d'un motif particulier : le motif des immunorécepteurs à base tyrosine. Selon les acides aminés entourant le ou les tyrosines, le récepteur sera activateur (ITAM) ou inhibiteur (ITIM) (Nakajima *et al*, 2000; Muta *et al*, 1994) (figure 4).

#### 1.1.3.2. NKG2

Une autre des familles de récepteurs est celle des NKG2. Les récepteurs de cette famille s'expriment en dimères en association avec CD94. Cette famille compte plusieurs membres et les plus connus sont NKG2A, NKG2B et NKG2C (Houchins *et al*, 1991) qui sont des récepteurs inhibiteurs s'associant au HLA de classe I, présent sur toutes les cellules du soi (Carretero *et al*, 1997). La combinaison NKG2A/CD94 a été rapportée comme pouvant refléter la tolérance des cellules NK du donneur envers le receveur. Plus il y aurait une forte expression de NKG2A/CD94, moins il y aurait de KIR et plus il y aurait de tolérance. Ce dimère ainsi que celui formé par NKG2C/CD94 reconnaît HLA-E. (Nguyen *et al*, 2005).

Parmi ces récepteurs, on retrouve également NKG2D, un récepteur activateur. Les ligands de ce récepteur sont MIC-A et MIC-B, des homologues des HLA de classe I exprimé lorsque la cellule subi un stress. NKG2D est un homodimère s'associant à la protéine adaptatrice Dap10 pour induire ensuite son signal d'activation



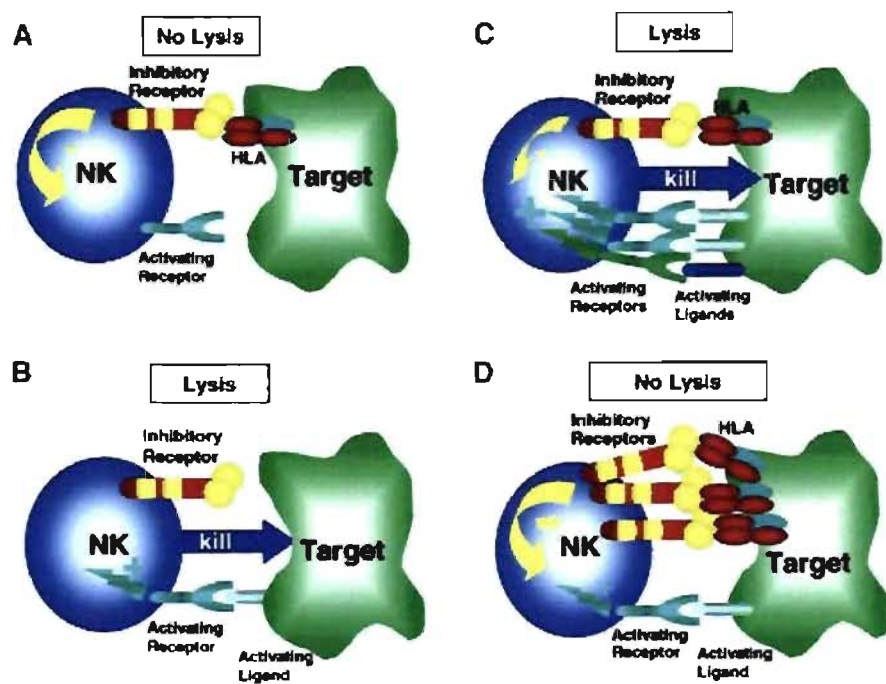
(Bauer *et al*, 1999) (Wu *et al*, 1999). De ce fait, il est rapidement devenu clair que NKG2D était essentiel à la lyse des cellules tumorales (Pende *et al*, 2001)(figure 4).

#### 1.1.3.3. NCR

Finalement, une des familles de récepteurs des cellules NK est celle des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR). Ces récepteurs sont membres de la superfamille des immunoglobulines associées aux ITAM. On connaît trois NCR : NKp46, NKp30 et NKp44. Ces récepteurs peuvent s'associer à plusieurs ligands afin d'induire un signal activateur. Cependant, les ligands des NCR ne sont toujours pas connus. Toutefois, la densité des ligands présents à la surface des cellules cibles ne semblent pas jouer un aussi grand rôle que la densité des NCR à la surface des cellules NK. En effet, moins la densité de NCR est grande moins l'effet cytotoxique est important. Une faible densité de NCR peut toutefois être compensée par la présence du ligand de NKG2D sur la cellule cible. Aussi, les différents NCR coopèrent ensemble pour reconnaître et lyser les cellules cibles (Moretta *et al*, 2000;Moretta *et al*, 2001).

#### 1.1.4. Le soi manquant

Les cellules NK ont la capacité de faire la distinction entre les cellules saines et les cellules tumorales ou infectées par un virus via leurs récepteurs. En effet, lorsqu'une cellule NK entre en contact avec une autre cellule, les récepteurs à la



**Figure 5 : Régulation de la réponse des cellules NK par les récepteurs d'activation ou d'inhibition. A et D** La cellule NK rencontre une cellule saine n'exprimant que peu ou plus de ligands des récepteurs inhibiteurs. Elle n'engendre donc pas de lyse. **B** La cellule NK rencontre une cellule tumorale engendrant plus de signaux activateurs que de signaux inhibiteurs. La lyse est donc engendrée. **C** La cellule NK rencontre une cellule tumorale n'exprimant plus de ligands pour les récepteurs inhibiteurs mais encore des ligands pour les récepteurs activateurs. La lyse est donc engendrée. (Farag *et al*, 2002)

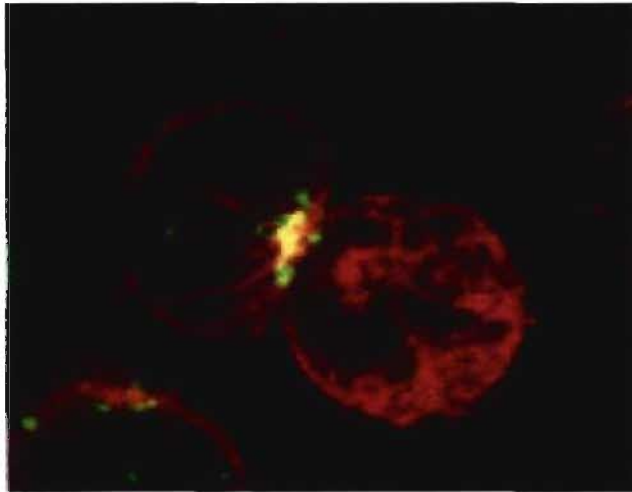
surface de la cellule NK trouveront leurs ligands pour induire un signal d'activation ou d'inhibition. C'est la balance entre les signaux d'activation et les signaux d'inhibition qui induira l'état d'activation de la cellule NK.

Normalement, une cellule saine exprime de façon définie une variété de HLA, mais lorsque la cellule acquiert une activité tumorale ou est infectée par un virus, cette expression de HLA peut être différente (Morris, 1990). Cette altération soudaine peut induire un signal d'activation ou ne pas induire un signal d'inhibition. La figure 5 illustre bien les différentes situations pouvant être rencontrées par les cellules NK.

### **1.1.5. Fonction**

#### **1.1.5.1. Cytotoxicité**

Afin de pouvoir exercer un effet cytolytique, les cellules NK doivent rencontrer plusieurs exigences. Évidemment, comme elles différencient le soi du non soi via des récepteurs activateurs et inhibiteurs, la première exigence est l'adhésion des cellules NK à la cellule cible. Cette adhésion entraîne automatiquement une polarisation des granules vers le site d'adhésion. Toutefois, l'adhésion et la polarisation ne suffisent pas à induire la dégranulation. Il doit alors y avoir interaction entre les différents récepteurs activateurs et leurs ligands pour induire un signal d'activation et de dégranulation. À ce moment, il y a libération au site d'adhésion d'un ensemble de granules principalement composé de perforine et de



**Figure 6 : Polarisation des granules suite à l'adhésion des cellules.** On observe les filaments d'actine en rouge, l'appareil de Golgi de la cellule effectrice en jaune, et la polarisation des granules colorées en vert. (Bossi & Griffiths, 2005).



granzymes (Grz) (Bryceson *et al*, 2005). La perforine est une protéine enzymatique capable de perforer la membrane des cellules (Smyth *et al*, 2005).

Bien qu'aucune littérature ne documente la présence de perforines à l'intérieur des cellules cibles, des hypothèses suggèrent que la perforine aurait un rôle à jouer dans l'arrêt du trafic des endosomes et aurait possiblement aussi un effet intracellulaire (Browne *et al*, 1999). Les Grz sont des sérines protéases et on en connaît cinq chez l'Homme : Grz A, B, H, K et M (Baker *et al*, 1994). Contrairement à la perforine, les Grz agissent exclusivement au niveau intracellulaire, souvent en créant un environnement engendrant l'apoptose (Smyth *et al*, 2005). Les cellules NK sécrètent majoritairement les Grz M (Kelly *et al*, 1996). Aucune différence au niveau de l'expression de la perforine et des granzymes n'a été remarquée chez les deux sous-populations de cellules NK (Konjevic *et al*, 1995).

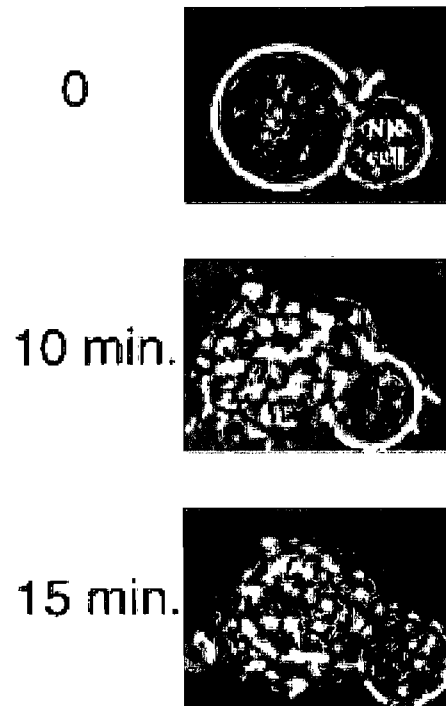
Finalement, les cellules NK possèdent un autre moyen d'engendrer la mort cellulaire. Elles peuvent exprimer des récepteurs induisant l'apoptose lorsque couplés à leur ligand respectif : FasL et TRAIL. FasL est reconnu comme étant un agent antitumoral *in vivo* (Bradley *et al*, 1998). De son côté, TRAIL est fortement exprimé par les cellules NK et est aussi responsable d'une partie de l'effet antitumoral contre les tumeurs exprimant son récepteur (Takeda *et al*, 2001).

#### 1.1.5.1.1. Cytotoxicité naturelle

La cytotoxicité naturelle des cellules NK est définie comme étant la réaction cytolytique spontanée des cellules NK envers une cellule infectée ou tumorale. Les récepteurs principalement responsables de cette cytotoxicité sont les NCR NKp46 et NKp40. On retrouve ces récepteurs chez les deux sous-populations de cellules NK (Moretta *et al*, 2001).

#### 1.1.5.1.2. Effet LAK

L'effet LAK (lymphokine activated killer) est l'activité cytotoxique induite par des lymphokines. Chaque cytokine induit une activité cytotoxique, mais il semble que cette activité ne soit pas constamment effectuée par la même sous-population de cellules NK. En effet, l'IL-15 et l'IL-21 induisent un phénotype CD16+/CD56<sup>bright</sup> ainsi qu'une forte cytotoxicité. Chez les cellules NK CD56<sup>dim</sup>, qui n'expriment pas ou très peu la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (CD25), l'effet cytotoxique induit par l'IL-2 est plus faible que celui induit par l'IL-15 et l'IL-21 (Parrish-Novak *et al*, 2000; Nagler *et al*, 1990).



**Figure 7 : Cytolyse par une cellule NK.** Progression à travers le temps d'une lyse cellulaire effectuée par une cellule NK. Cette figure a été empruntée de l'Institut national de recherche pédagogique, France ([www.inrp.fr](http://www.inrp.fr))

#### 1.1.5.1.3. ADCC

Enfin, on retrouve une troisième forme d'activité cytotoxique : la cytotoxicité dépendante d'une stimulation par des anticorps (ADCC). L'ADCC est strictement réservée aux cellules NK CD16+ puisqu'elle requiert la reconnaissance de la partie Fc des anticorps IgG par ce récepteur (Hulett & Hogarth, 1994). Cette activité cytotoxique est aussi efficace que les autres. De plus, l'expression de CD16, comme mentionné précédemment, peut être augmentée suite à une stimulation (Parrish-Novak *et al*, 2000).

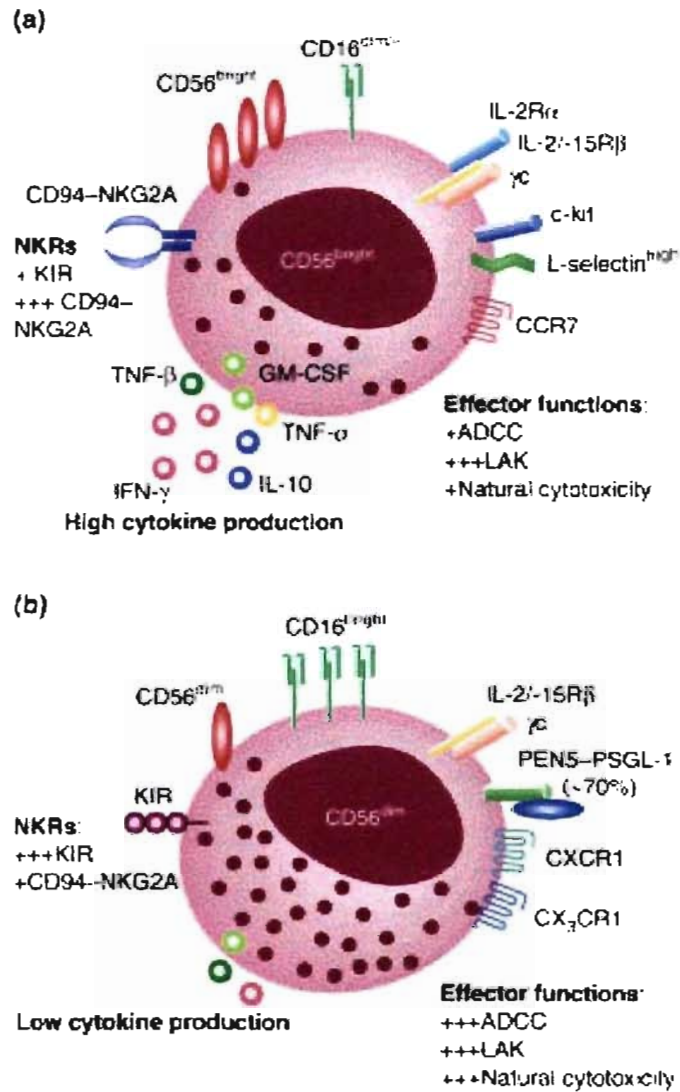
Une activation via CD16 engendre une augmentation de la transcription de FasL. Ainsi, l'activation des cellules NK via CD16 peut engendrer une mort cellulaire via FasL (Montel *et al*, 1995).

#### 1.1.5.2. Production de cytokines

Si les cellules NK CD16+ ont comme fonction prioritaire d'exercer une ADCC, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> ont pour leur part la responsabilité de produire des cytokines. Ainsi, les deux sous-populations ont un rôle principal différent et bien défini. Tout comme pour les CD16+, les CD56<sup>bright</sup> doivent être stimulées pour produire différentes cytokines. Cette stimulation est toutefois facile à obtenir puisque les cellules NK expriment constitutivement les récepteurs des cytokines produites par les monocytes (monokines) (Fehniger *et al*, 1999). Ces monokines sont

principalement l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18. De plus l'IL-2 est également une excellente cytokine stimulatrice pour les CD56<sup>bright</sup>. Cependant, la stimulation par une seule cytokine n'induit que peu de production de cytokines par les cellules NK. Une combinaison entre les différentes cytokines induit une production plus élevée. De plus, différentes combinaisons induisent la production de différentes cytokines. Une combinaison d'IL-12 et d'IL-18 est optimale si l'on veut obtenir la production d'IFN- $\gamma$ , alors qu'une combinaison d'IL-15 et d'IL-18 donne une forte production de facteur de stimulation de colonie des macrophages et des granulocytes (GM-CSF). Finalement, une combinaison de l'IL-12 et l'IL-15 induit une forte production d'IL-10 alors qu'une combinaison IL-2 et IL-15 induit une production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-15 et d'IL-13 (Cooper *et al*, 2001b; Lanier *et al*, 1986).

Le PMA, surtout combiné à l'ionomycine, est un facteur stimulant des cellules NK. Lorsqu'on stimule les CD56<sup>bright</sup> avec ce mélange, on obtient une très forte production de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , le facteur de nécrose tumorale (TNF) et le GM-CSF (Cooper *et al*, 2001b). En plus des monokines, d'autres cytokines peuvent stimuler la cellule NK. En effet, l'IFN- $\gamma$  est autocrine et stimule la production d'IL-12 (Yoshida *et al*, 1994).



**Figure 8 : Sous-populations des cellules NK. A** Schéma représentant la sous-population de cellules NK CD56<sup>bright</sup>. **B** Schéma représentant la sous-population de cellules NK CD56<sup>dim</sup>. (Cooper *et al*, 2001a)

### 1.1.6. Cellules NK et immunité antivirale

Les virus, contrairement aux bactéries, ont un mode d'infection intracellulaire. De ce fait, la défense de l'hôte contre une infection virale se fait majoritairement de manière indirecte. En effet, la réponse se fait principalement sur la cellule infectée. L'immunité antivirale s'effectue via deux mécanismes : une réponse non spécifique de la part des cellules NK et une réponse spécifique par les lymphocytes T.

Les cellules NK reconnaissent une cellule infectée selon deux mécanismes. Premièrement, plusieurs virus, pour échapper à une reconnaissance par les lymphocytes T, diminuent l'expression de molécules du CMH de classe I à la surface des cellules infectées. Ceci a comme effet de diminuer les signaux inhibiteurs induits par les KIR et donc de favoriser une activation des cellules NK (Tomasec *et al*, 2000). Aussi, certains virus ont la capacité d'augmenter à la surface des cellules qu'ils infectent l'expression de ligands de récepteurs activateurs de cellules NK. Cela a pour effet d'augmenter l'activation des cellules NK et ainsi d'engendrer une résistance contre ces virus (Brown *et al*, 2001; Lee *et al*, 2001).

Bien que des indices nous laissent croire que la lyse des cellules infectées pourrait avoir un rôle à jouer dans la lutte contre les virus, sa contribution n'est pas encore très bien élucidée (Biron & Brossay, 2001). Toutefois, le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans la lyse des cellules infectées est beaucoup mieux décrit. Tout d'abord, une étude montre qu'il pourrait avoir un rôle important localement dans la protection contre la mort

cellulaire des cellules environnantes non infectées lorsqu'il y a présence de grandes concentrations de virus (Salazar-Mather *et al*, 2000). Finalement, l'IFN- $\gamma$  a également une action directe sur les virus : il est impliqué dans l'inhibition de la réplication virale (Orange *et al*, 1995).

Le rôle des cellules NK ne se limite cependant pas à un effet direct sur les cellules infectées. En effet, via la sécrétion de cytokines, elles peuvent activer les macrophages et induire l'inflammation du site d'infection pour ainsi favoriser la réponse immunitaire (Biron & Brossay, 2001).

### **1.1.7. Cellules NK et immunité antitumorale**

#### **1.1.7.1. Activité**

Puisque les cellules NK ont été découvertes dans le cadre du traitement d'une tumeur, on leur a rapidement attribué un rôle d'agent effecteur de cette immuno-surveillance (Kiessling *et al*, 1978).

Dans le cas de leucémie, l'effet GVL primaire est induit par la cytotoxicité naturelle. Cette activité cytotoxique est principalement effectuée via la reconnaissance de MIC-A et MIC-B, les ligands de NKG2D. MIC-A et MIC-B sont des molécules apparentées au HLA de classe I et exprimées lorsqu'une cellule subit un stress. Ces molécules sont donc souvent exprimées par les cellules tumorales (Pende *et al*, 2001).



#### 1.1.7.2. IFN- $\gamma$

L'IFN- $\gamma$  exerce un rôle critique dans la lutte contre les tumeurs. Par lui seul, il est capable de réguler plus de 200 gènes ayant un rôle spécifique au sein de la cellule. De plus, il induit chez la cellule cible l'expression des molécules de HLA, ce qui a pour effet d'activer encore davantage les cellules T. Il peut également avoir un effet sur les lymphocytes T en influençant la voie Th1 ou Th2. Aussi, l'IFN- $\gamma$ , en induisant les voies innée et adaptative de l'immunité, rassemble toutes les forces nécessaires pour éliminer la tumeur (Boehm *et al*, 1997). Finalement, une récente étude a montré que l'effet antitumoral serait principalement effectué via les cellules NK CD56<sup>bright</sup> présentes au cœur de la tumeur et ce, directement par la production d'IFN- $\gamma$  (Carrega *et al*, 2008).

L'interféron  $\gamma$  peut également avoir des effets indésirables. En effet, il promeut la voie Th1 et induit donc des conditions inflammatoires. Des maladies auto-immunes peuvent alors se développer (Pollard *et al*, 2003).

#### 1.1.8. Histocompatibilité réduite des cellules NK greffées

Dans le cadre de la lutte contre des leucémies, les cellules NK ont donc un rôle important à jouer en éliminant les cellules leucémiques résiduelles. Elles diminuent ainsi les chances de récives.

De plus, les cellules NK s'attaqueront également aux cellules immunitaires de l'hôte. En effet, lorsqu'il y a disparité entre les récepteurs KIR de l'hôte et les ligands correspondant du donneur, les cellules NK par le phénomène du soi manquant reconnaîtront les APC comme étrangères et effectueront une cytolyse (Ruggeri *et al*, 2002). Puisque les APC se retrouvent en moins grand nombre, il y a alors moins de présentation des antigènes du receveur aux lymphocytes T du donneur. Ceux-ci sont donc moins réactifs contre l'hôte (Shlomchik *et al*, 1999).

Tout comme pour les APC, les cellules NK reconnaissent les lymphocytes T résiduels comme étant étrangers et effectuent une cytolyse. Ces lymphocytes T résiduels sont responsables du rejet de la greffe. Puisque ceux-ci sont éliminés par les cellules NK, les rejets de greffe deviennent moins fréquents (Shlomchik *et al*, 1999).

## **1.2. IL-7**

### **1.2.1. Définition**

L'IL-7 a été découvert à l'origine comme étant un stimulant des précurseurs B (Namen *et al*, 1988). Puis, on a découvert qu'il était aussi un facteur de croissance et de survie pour les thymocytes ainsi qu'un régulateur de la croissance des lymphocytes T (Murray *et al*, 1989) (Armitage *et al*, 1990). De plus, l'IL-7 est nécessaire au maintien des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoire (Seddon *et al*, 2003).

### 1.2.2. Récepteur

On ne peut parler de l'IL-7 sans parler de son récepteur. Dans l'approfondissement des connaissances sur l'IL-7, il a rapidement été évident que son récepteur portait une chaîne commune à certains autres membres de sa famille de cytokines, c'est-à-dire la chaîne  $\gamma_c$  (CD132). De plus, il porte une autre chaîne  $\alpha$  (CD127) (Leonard, 2002) (figure 9). La combinaison de ces deux chaînes forme le récepteur de l'IL-7 qui peut avoir deux formes, une membranaire et l'autre sécrétée (Goodwin *et al*, 1990). L'expression de CD127 est maintenant un facteur de discrimination entre les sous-populations des lymphocytes T. En effet, comme mentionné préalablement, CD127 est un marqueur de  $CD4^+$  mémoire mais sa perte sur ces mêmes  $CD4^+$  est maintenant utilisé comme marqueur de progression du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). De plus, non seulement la survie des  $CD4^+$  est affectée par la perte de l'expression de CD127 mais ce phénomène est également inversement corrélée avec l'activation du système immunitaire (Colle *et al*, 2007). CD127 est également un marqueur des lymphocytes T régulateurs puisque son expression est inversement corrélée à l'expression de FoxP3 (Liu *et al*, 2006). Puisque l'IL-7 n'est pas essentiel au développement des cellules NK, son récepteur ne l'est pas d'avantage (He & Malek, 1996). Chez les cellules NK, on sait que l'IL-7 induit une augmentation de la cytotoxicité naturelle mais, jusqu'à très récemment, personne n'avait montré la présence du récepteur de l'IL-7 chez les cellules NK. Ainsi, on sait depuis peu que chez la souris, CD127 est présent chez les cellules NK

ayant mûri dans le thymus seulement (Vosshenrich *et al*, 2006). CD127 a comme inducteurs les glucocorticoïdes, le FLT3 ligand, le TNF et les IFN- $\alpha$  et  $\gamma$  (Mazzucchelli & Durum, 2007). Effectivement, la région promotrice du gène du récepteur de l'IL-7 contient un élément régulé par l'interféron (IRE). Les facteurs nucléaires IRF-1 et IRF-2 induits par l'interféron- $\alpha$  peuvent s'y fixer (Pleiman *et al*, 1991).

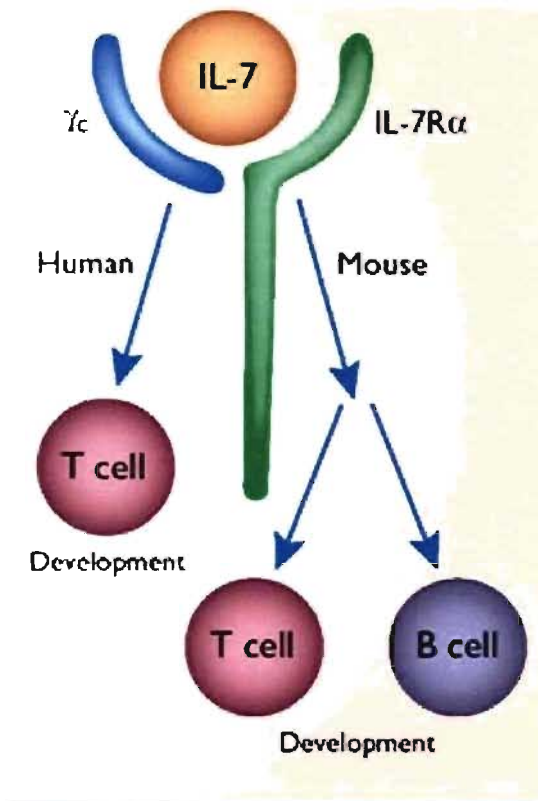


Figure 9: Récepteur de l'IL-7. (Leonard, 2002)

### 1.2.3. Rôle de l'IL-7 dans la lymphopoïèse

Comme mentionné précédemment, l'IL-7 a été découvert comme étant un stimulant des précurseurs de lymphocytes B. Or, il s'avère que non seulement il est important dans la lymphopoïèse des lymphocytes B, mais également dans celle des lymphocytes T.

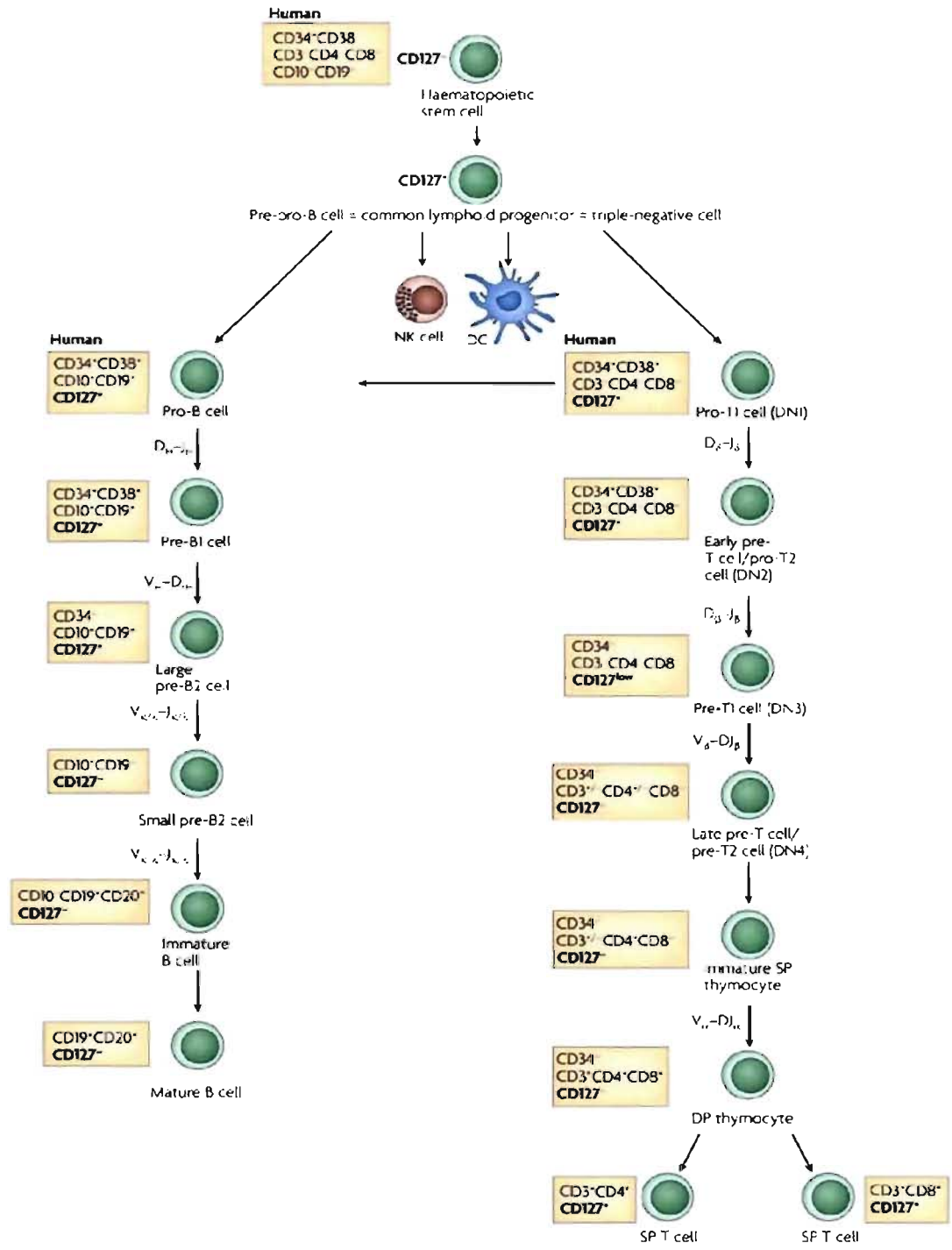
Le rôle de l'IL-7 dans la lymphopoïèse n'est pas relié à la différenciation mais plutôt à la survie et la prolifération des populations (Jiang *et al*, 2005). On retrouve dans la moelle osseuse des CSH, évidemment, mais également des formes plus matures de cellules. La première différenciation des CSH donne naissance aux progéniteurs communs de cellules lymphoïdes (CLP). Ces CLP ont la capacité de générer des lymphocytes T et B. On peut facilement différencier les CPL par leur haute expression de CD127 (Miller *et al*, 2002). Lorsqu'on regarde séparément la maturation des lymphocytes B et T, on observe que CD127 est exprimé dans la lignée B jusqu'au stade de cellules pré-B (Mazzucchelli & Durum, 2007). Les études sur la maturation des progéniteurs T nous ont permis de savoir que CD127 était exprimé chez les lymphocytes T double négatifs, mais que progressivement, évoluant vers un stade double positif, ils perdent cette expression. Finalement, il y a un retour de l'expression de CD127 avec la différenciation finale des lymphocytes T en simple positifs (Sudo *et al*, 1993).

Dans le cas particulier des progéniteurs T double négatifs, l'IL-7 joue un plus grand rôle. En effet, l'IL-7 est essentiel au réarrangement des gènes codant pour la chaîne

γ du récepteur des cellules T (Maraskovsky *et al*, 1997). L'absence d'IL-7 ou de son récepteur entraîne une immunodéficiência sévère au niveau des lymphocytes T, sans toutefois que les cellules NK ne soient affectées par l'une ou l'autre des ces absences (Puel *et al*, 1998).

L'IL-7 n'a pas que des effets sur les progéniteurs lymphoïdes. Il est un important régulateur de la croissance des lymphocytes T (Murray *et al*, 1989; Armitage *et al*, 1990) et est nécessaire au maintien des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires (Seddon *et al*, 2003).

La présence du récepteur de l'IL-7 sur les cellules NK matures et l'effet de l'IL-7 sur ces cellules sont mal connus. Chez la souris, la maturation des cellules NK s'accompagne d'une perte de l'expression du récepteur de l'IL-7 (Colucci *et al*, 2003). L'expression du récepteur de l'IL-7 sur les cellules NK matures humaines était inconnue quand nous avons entrepris ce travail. Cependant, deux études montrent que l'IL-7 aurait un effet sur les cellules NK matures. Une première montre que l'IL-7 induirait la survie des cellules NK via Bcl2 et la seconde montre que l'IL-7 induirait une activité cytotoxique des cellules NK CD56<sup>bright</sup> (Armant *et al*, 1995; Dadmarz *et al*, 1994).



**Figure 10 : Expression de CD127 sur les lignées lymphoïdes. (Mazzucchelli & Durum, 2007)**



#### 1.2.4. IL-7 et greffe de CSH

Précédemment aux études cliniques présentement en cours, une étude clinique a démontré que l'administration de l'IL-7 chez des patients greffés de moelle osseuse a augmenté la vitesse de reconstitution des lymphocytes T sans pour autant augmenter le taux de GVHD. Cette étude montre aussi que la survie générale des patients est meilleure en présence d'IL-7 (Alpdogan *et al*, 2001).

Précédemment, d'autres études avaient montrées que l'administration de l'IL-7 suite à une greffe de CSH chez les souris aidait à l'élimination du virus influenza en 12 jours. De plus, le traitement par l'IL-7 engendrait une plus grande production d'anticorps et une plus grande activité cytotoxique de la part des lymphocytes T comparativement à à une traitement par l'IL-2 (Abdul-Hai *et al*, 1997). Une autre étude amène également la possibilité que l'IL-7 augmente la réponse des lymphocytes T face à des antigènes faiblement reconnus présents chez certains virus et tumeurs (Yewdell & Del Val, 2004). Finalement, il semble que l'effet de l'IL-7 soit persistant après plusieurs mois malgré une administration dans une période de temps restreinte. Les effets post administration en terme de production d'anticorps et d'activité cytotoxique induite ont même été supérieurs à ceux induits par l'IL-2 et égaux à ceux induits par l'IL-15 (Snyder *et al*, 2006).

Ainsi, puisqu'une discordance existe présentement dans la littérature à propos de l'effet de l'IL-7 sur les cellules NK, que des essais cliniques avec l'IL-7 ont été effectués et sont présentement en cours dans le cadre de greffes de moelle osseuse

et semblent améliorer l'état des patients, nous émettons l'hypothèse que l'IL-7 peut augmenter l'activité cytotoxique des cellules NK, leur prolifération et leur production d'IFN- $\gamma$ . De plus, nous faisons l'hypothèse que l'IL-7 peut réduire l'apoptose et augmenter l'expression de marqueurs d'activation tels que CD25 et CD69 et des récepteurs activateurs tels que NKG2D. Ainsi, l'IL-7 pourrait induire chez les cellules NK du sang de cordon une activité antitumorale contre les cellules leucémiques subsistantes suite à une greffe de sang de cordon. Nous nous sommes donc donné comme but de caractériser l'effet de l'IL-7 sur les cellules NK matures.

## **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1. Préparation des cellules NK**

#### **2.1.1. Collecte des échantillons**

Les études ont été effectuées sur 100 mL de sang périphérique provenant de sept volontaires différents. Les échantillons de sang ont été récoltés sur tubes héparinés. Le consentement écrit de chacun des volontaires sains a été obtenu avant le prélèvement et le projet a été approuvé par le comité d'éthique du centre de recherche de l'hôpital Ste-Justine.

#### **2.1.2. Isolation des cellules mononuclées du sang**

Les cellules mononuclées du sang (PBMC) ont été séparées des autres cellules par ficoll (Ficoll-Hypaque Plus : Amersham Bioscience, Piscataway, NJ). Après avoir dilué le sang avec un volume égal de milieu et déposé le tout sur le ficoll, le sang a été centrifugé à une vitesse de 1800 tours/minute pendant 20 minutes. Suite à la centrifugation, nous avons récolté l'anneau de PBMC à l'interface ficoll sérum pour ensuite les laver deux fois avec une solution de tampon de phosphate salin (PBS) à 2% de sérum fœtal bovin (FBS) et en centrifugeant 10 minutes à 1800 tours/minute. La viabilité et le décompte des PBMC ont été évalués par une coloration au bleu de trypan.

### **2.1.3. Purification des cellules NK**

L'isolation des cellules NK s'est faite sur des colonnes LD (sélection négative) (Macs Miltenyi, Auburn, CA, USA), avec le *StemSep NK Cell Enrichment kit* (StemCell Technology, Vancouver, BC, Canada) selon les instructions du manufacturier. La quasi totalité des PBMC récoltés a été purifiée par colonne, soit environ 100 millions. Nous avons d'abord incubé les PBMC avec des anticorps dirigés contre CD3, CD4, CD19, CD14, CD66b et la Glycophorin A pendant 30 minutes à la température de la pièce. Cette étape permet la fixation des anticorps sur les lymphocytes T, NKT et B, ainsi que les monocytes, les macrophages, les granulocytes et les globules rouges (soit toutes les cellules sauf les cellules NK). Les anticorps utilisés forment en fait un complexe tetramérique contenant un anti dextran. Ce dernier reconnaît les billes magnétiques que nous ajoutons et faisons incuber pendant 30 minutes à la température de la pièce. En passant la colonne LD à travers un champ magnétique, les cellules sur lesquelles on retrouvait les complexes anticorps-bille ont été retenues et seules les cellules NK ont été récoltées. La solution tampon utilisée pour suspendre les PBMC et préparer la colonne est composée de PBS à 0.5% de sérum d'albumine bovine (BSA) et de 2mM d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA). Après séparation, les cellules NK récoltées ont été lavées avec du PBS + 2% FBS et leur viabilité ainsi que leur dénombrement évalués à l'aide du bleu de trypan. Lorsque nous passons nos

cellules à travers deux colonnes, nous avons une pureté, vérifiée par cytométrie, au dessus de 90%.

#### **2.1.4. Culture cellulaire**

Toutes les cultures cellulaires ont été faites dans le milieu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) supplémenté de 10% de FBS, 20mM L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline G, 100 µg/ml de sulfate de streptomycine et 0.25µg/ml d'amphotéricine B. Les cultures ont été effectuées à un million de cellules par mL de milieu. Nous avons utilisé les concentrations suivantes pour les traitements avec les différentes cytokines : 1000U/mL pour l'IL-2 et 50 ng/mL d'IL-15. Les concentrations d'IL-7 utilisées sont mentionnées selon les tests effectués. Les milieux et les cytokines ont été changés à tous les deux jours. Les cellules ont été gardées à 37° C à 5% de CO<sub>2</sub>.

## **2.2. Phénotypage par cytométrie en flux**

### **2.2.1. Marquage de base**

Nous avons marqué les cellules avec des anticorps contre CD3, CD56, CD25, CD69, CD127 (clone hIL-7R-M21), CD158a et CD158b (KIR2DL1), NKB1 (KIR3DL1), CD45RO et NKG2D de BD Biosciences (San Jose, USA). L'anticorps contre NKG2A a été acheté chez Immunotech (Vaudreuil-Dorion, Qc, Canada) L'anticorps de Vosshenrich contre

CD127 (clone 40131, R&D Systems, Minneapolis, USA). Nous avons d'abord incubé les cellules avec 5 µg d'immunoglobulines de souris (par million de cellules), afin d'éviter une fixation non spécifique de nos anticorps sur les récepteurs des fragments Fc des Ig. Après une incubation de 10 minutes à température pièce, nous avons ajouté 5 µL d'anticorps par million de cellules. Nous avons incubé dans le noir à température pièce pendant 30 minutes. Afin d'enlever les anticorps ne s'étant pas fixés, nous avons fait deux lavages avec du PBS 2% FBS (centrifugation de 4 minutes à 4000 tours/minute). Le FacsCalibur de Beckton-Dickinson (San Jose, USA) a été le cytomètre utilisé et le logiciel d'analyse est le Flow Jo (Tree Stars inc., Ashland, USA).

### **2.2.2. Stimulation à l'INF-α**

Afin de comparer l'effet de l'IL-7 sur son récepteur, nous avons stimulé des PBMC avec l'INF-α. Une fraction des PBMC récoltés a été traitée avec 1000U d'INF-α par mL de milieu. Les cellules ont été laissées en culture pendant 24 heures puis marquées par des anticorps contre CD3, CD56 et CD127 selon la méthode précédemment décrite.

### **2.2.3. Prolifération**

Les essais de prolifération ont été réalisés par le marquage des cellules avec du CFSE (CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester) (BD Bioscience, San Jose, USA). Le principe du marquage consiste à introduire un colorant non toxique (le CFSE) dans la cellule visée. À chaque division de la cellule, le CFSE se répartit également entre les deux cellules filles. Ainsi, nous pouvons observer des strates correspondant à chaque génération de cellules. Plus la cellule d'origine s'est divisée, plus l'intensité finale du colorant sera faible. Nous devons premièrement isoler les cellules que l'on voulait marquer. Puis, nous marquons avec une solution contenant 0,5 mM de CFSE. Quatre  $\mu\text{L}$  de cette dilution par million de cellules resuspendues dans un mL de PBS + 0,3% BSA ont ensuite été ajoutés. Nous avons incubé pendant 10 minutes à la noirceur en agitant à toutes les minutes. Afin d'éliminer le CFSE non incorporé dans les cellules, nous avons effectué quatre lavages avec du PBS + 0,3% BSA et 10 minutes de centrifugation à 1600 tours/minute. La viabilité et le dénombrement des cellules ont ensuite été évalués. Finalement, les cellules ont été mises en culture pendant sept jours selon les conditions habituelles. Le CFSE est détecté par le filtre 1 du cytomètre. Comme nous devons utiliser une forte concentration de CFSE pour pouvoir détecter la perte d'intensité progressive au fil des générations cellulaires, le signal perçu par FL1 était très fort. Comparativement au signal émis par la phycoérythrine, la différence devient très importante et nécessiterait une grande compensation. Afin d'éviter ce problème de compensation, nous n'avons pas utilisé

de la phycoérythrine comme fluorochrome pour identifier CD56 ou CD3, mais plutôt de l'allophycocyanine.

#### **2.2.4. Mort cellulaire**

Afin d'effectuer des tests d'apoptose et de nécrose cellulaire sur nos cellules NK, nous avons dû purifier celles-ci puisque des chevauchements importants des spectres lumineux émis par les fluorochromes nécessaires à l'identification des sous-populations lymphocytaires nous empêchaient d'utiliser le filtre FL3 sur le FACS Calibur. Suite à la purification, nous avons mis en culture les cellules NK pendant 72h. Nous avons utilisé l'Annexin V conjuguée au FITC (kit incluant la solution de liaison, BD Bioscience) pour détecter les cellules en apoptose et le 7-AAD pour les cellules en nécrose. Les deux produits ont été acquis de BD Bioscience. Dans les premiers stades de l'apoptose, le phospholipide phosphatidylsérine (PS) est externalisé sur la membrane cellulaire et l'Annexin V est une protéine qui s'attache aux phospholipides, surtout le PS. De son côté, le 7-AAD marque toutes les cellules en processus de mort cellulaire. Donc un double marquage permet d'identifier les cellules viables (Annexin V négatif, 7-AAD négatif), une apoptose précoce (Annexin V positif, 7-AAD négatif) et mort cellulaire ou apoptose tardive (Annexin V positif, 7-AAD positif). Pour marquer les cellules, nous les avons d'abord lavé dans du PBS froid. Puis, nous les avons suspendues dans un mL de tampon de liaison à une concentration de un million de cellules/mL. Puis, nous avons pris un échantillon de



100  $\mu\text{L}$  que nous avons incubé avec l'Annexin V pendant 15 minutes à la température de la pièce, dans le noir. Après cinq minutes, nous avons ajouté le 7 AAD. Lorsque l'incubation fut terminée, nous avons ajouté 400  $\mu\text{L}$  de tampon de liaison et passé au cytomètre.

### **2.3. Activité cytolytique par libération de chrome**

Cette technique consiste à introduire une molécule (chromate de sodium) radioactive dans des cellules qui serviront de cibles à des cellules capables d'effectuer une cytolyse. La lyse des cellules cibles engendre une libération du composé radioactif dans le milieu. Cette quantité de radioactivité est proportionnelle au nombre de cellules lysées. Les cellules cibles utilisées sont les K562. Ce sont des cellules issues d'une leucémie myéloïde chronique et facilement lysées par des cellules NK. Les K562 sont préalablement marquées avec 100  $\mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  par million de cellules. Une incubation de 60 minutes à 37° C et en agitant à toutes les 15 minutes permet l'incorporation du  $^{51}\text{Cr}$  dans les cellules. Afin d'enlever l'excédent de  $^{51}\text{Cr}$ , nous avons effectué quatre lavages à l'aide de milieu de culture et de centrifugation de deux minutes à 8000 tours/minute. Puis, les cellules effectrices, ici les cellules NK, ont été mises en contact avec les cellules cibles selon trois ratios pendant quatre heures. Les ratios représentent le nombre de cellules effectrices mises en contact avec une cellule cible. Pour s'assurer qu'un nombre suffisant de cellules NK entre en contact avec les cellules cible lorsque nous utilisons

les PBMC totaux, nous utilisons des ratios plus élevés. Évidemment, plus le ratio est faible, moins nous devrions observer de lyse. Il est très probable que la lyse observée soit due aux cellules NK elles-mêmes, en raison des conditions expérimentales choisies (incubation de 4 heures, et utilisation de cibles spécifiques des cellules NK). Tous les milieux et matériaux radioactifs ont été récupérés dans un contenant sécuritaire et prévu à cet effet. La lecture de la quantité de  $^{51}\text{Cr}$  relâchée dans le milieu s'est faite grâce à un lecteur de radiation gamma Cobra II (PerkinElmer, Waltam, MA, USA). La formule utilisée pour calculer les pourcentages de lyses a été la suivante :

$$(\text{É} - \text{Min}) / (\text{Max} - \text{Min})$$

où É est l'émission de l'échantillon, Min est l'émission minimale (aucune lyse) et Max est l'émission maximale (lyse de toutes les cellules). La lyse maximale a été effectuée en ajoutant 100 uL de HCl 1N à un puits contenant seulement les cellules cibles.

#### **2.4. Production d'IFN- $\gamma$**

Les surnageants de cultures des cellules à une concentration de 1 à 1,5 million de cellules par mL de milieu, avec des traitements différents, ont été récoltés après 48 heures et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La quantité d'interféron- $\gamma$  présente dans les surnageants fut évaluée avec le kit d'ELISA Interféron-gamma de Biosource

(Invitrogen, Burlington, ON, Canada), selon les instructions du manufacturier. Brièvement, les échantillons et standards ont été ajoutés aux puits de la plaque prétraitée avec un anticorps contre l'IFN- $\gamma$ . Puis, nous avons ajouté successivement un anticorps biotinylé contre l'IFN- $\gamma$ , pendant 90 minutes, suivi de peroxydase conjuguée à la streptavidine (qui s'attache à la biotine) pendant 45 minutes et finalement un chromogène (TMB), qui réagit avec la peroxydase pour produire un composé coloré, suivi d'une solution d'arrêt 30 minutes plus tard. La couleur du produit de la réaction enzymatique, qui est proportionnelle à la concentration d'IFN- $\gamma$  présente, est ensuite lue à 450nm par un lecteur de plaques Sunrise de Tecan (Tecan System inc., San Jose, USA). À l'aide des densités optiques récoltées à partir des standards, nous pouvons établir une courbe et déterminer la concentration d'IFN- $\gamma$  dans chacun des puits (échantillons).

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1. Récepteur de l'IL-7

##### 3.1.1. Expression de CD127

La littérature concernant la présence du récepteur de l'IL-7 sur les cellules NK est assez minime et contradictoire. En effet, il a d'abord été suggéré que CD127 n'était pas présent sur les cellules NK matures (Colucci *et al*, 2003). Puis, à partir de résultats chez la souris, il a été avancé que CD127 n'était présent que chez les NK ayant eu une maturation thymique (Vosshenrich *et al*, 2006).

Ainsi, avant de pouvoir vérifier l'effet de l'IL-7 sur les cellules NK périphériques, il était important de déterminer si ces derniers exprimaient le récepteur de l'IL-7 (IL-7R). Pour ce faire, nous avons utilisé un anticorps contre CD127, soit la chaîne alpha puisque cette dernière est pratiquement restreinte à IL-7R. En examinant cette expression chez les deux sous-populations de cellules NK, nous constatons que CD127 est fortement exprimé chez les cellules NK CD56<sup>bright</sup> et faiblement exprimé chez les cellules NK CD56<sup>dim</sup> (figure 1A).

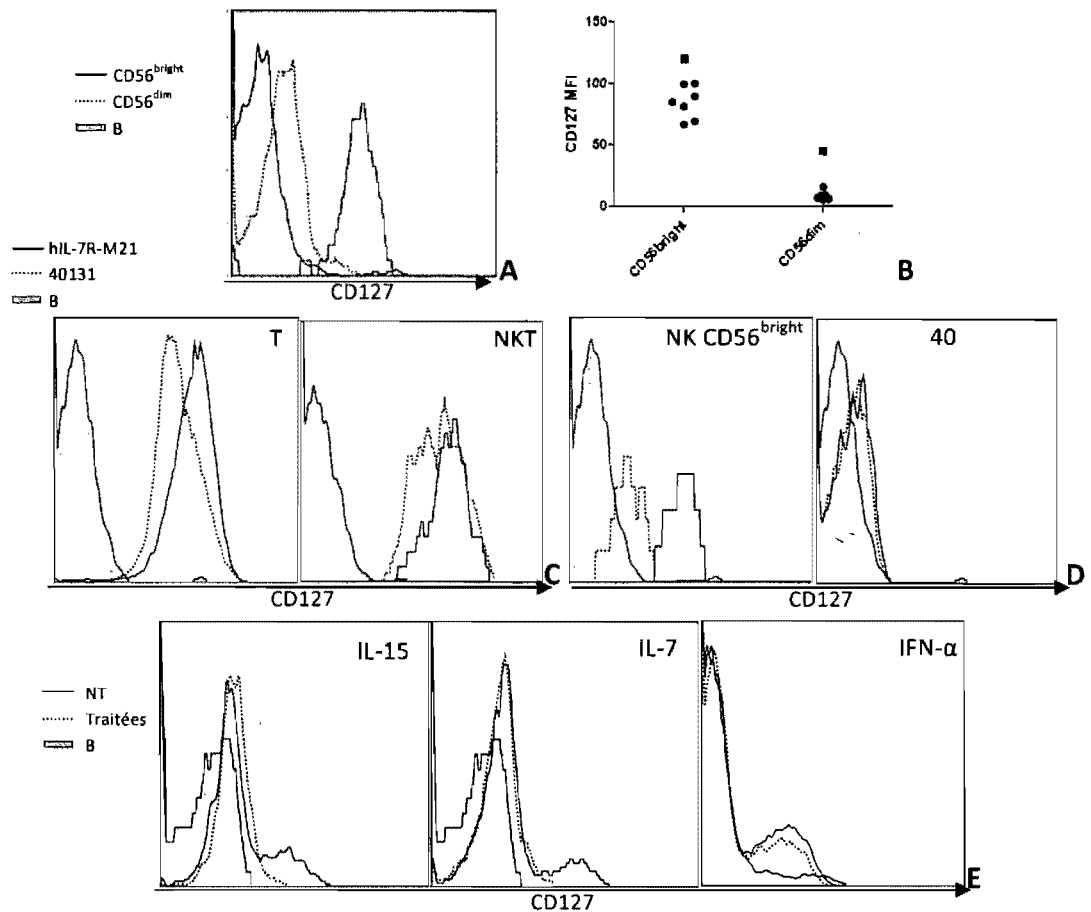
Afin de vérifier l'hypothèse que CD127 ne serait exprimé que sur des cellules NK ayant eu une maturation thymique, nous avons vérifié l'expression de CD127 chez un patient atteint d'un Di George complet, seule situation clinique où l'absence de thymus est complète. Cette condition nous assurait qu'aucune maturation

thymique ne pouvait être possible. La figure 1B nous montre non seulement que les cellules NK de ce patient expriment CD127 mais également avec une plus grande intensité.

La littérature sur l'expression de CD127 sur les cellules NK montre que CD127 n'est présent que sur les cellules NK ayant subi une maturation thymique (Vosshenrich et al, 2006). Afin d'évaluer la cause de la différence entre nos résultats et ceux de l'équipe de Vosshenrich (anticorps 40131) et étant donné que nous avons utilisé un autre anticorps, le hIL-7R-M21, nous avons marqué des cellules T, NKT et NK avec les deux anticorps spécifiques à CD127. Si nous comparons chacune des populations lymphocytaires, nous constatons une différence de marquage constante entre les deux anticorps (figure 1C). De plus, lorsque nous comparons les deux anticorps à l'intérieur des cellules NK, nous constatons que la capacité de reconnaissance de l'anticorps 40131 pour CD127 est faible et identique chez les CD56<sup>dim</sup> et les CD56<sup>bright</sup> contrairement à notre anticorps (hIL-7R M21) (figure 1D).

Nous venons de montrer que CD127 est exprimé par une grande majorité de cellules NK périphériques mais nous ne savons pas si le récepteur lie l'IL-7. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons stimulé les cellules NK avec différentes cytokines : l'IL-15, l'IL-7 et l'IFN- $\alpha$ . Nous constatons que l'ajout d'IL-7 induit une perte d'expression de CD127 (figure 1E). Il en est de même lorsqu'on traite avec deux cytokines qui ont un récepteur comprenant la chaîne  $\gamma_c$ : l'IL-15 à 50 ng/mL (figure 1E). Par contre, lorsqu'on traite avec l'IFN- $\alpha$  à 1000 U/mL, on ne constate

aucune modification dans l'expression de CD127, confirmant ainsi que la mobilisation du récepteur n'est pas due à l'activation de la cellule NK (figure 1E). Ceci montre que le récepteur de l'IL-7 lie l'IL-7.



**Figure 1 : Expression de CD127 sur des cellules NK.** Les lymphocytes ont d'abord été sélectionnés par leur rapport taille granulosité (FSC/SSC). Puis les lymphocytes exprimant CD56 mais pas CD3 sont considérées comme étant des NK. **A** La courbe colorée représente les lymphocytes B et constitue le contrôle négatif. La courbe pointillée représente les NK CD56<sup>dim</sup> et la courbe pleine les NK CD56<sup>bright</sup>. Cette figure est représentative de 7 donneurs différents. **B** Les points ronds représentent l'expression chez des adultes sains. Les points carrés représentent l'expression chez un patient atteint de Di George complet. **C** Expression de CD127 chez les cellules T à gauche et NKT à droite. **D** Expression de CD127 sur des cellules NK. La courbe colorée représente les lymphocytes B, la courbe pleine est l'anticorps hIL-7R-M21 et la courbe en pointillées est l'anticorps 40131. **E** Expression de CD127 suite à différentes stimulations. Dans la figure de gauche, la courbe colorée représente les lymphocytes B, la courbe plein représente les PBMC non traités, la courbe en pointillée les PBMC traités avec de l'IL-15. Dans la figure du centre, la courbe en pointillée les PBMC traités avec de l'IL-7. Dans la figure de droite, la courbe en pointillée les PBMC traités avec l'IFN- $\alpha$ . Ces résultats sont représentatifs de six donneurs.

## **3.2. Effet de l'IL-7 sur les cellules NK non purifiées**

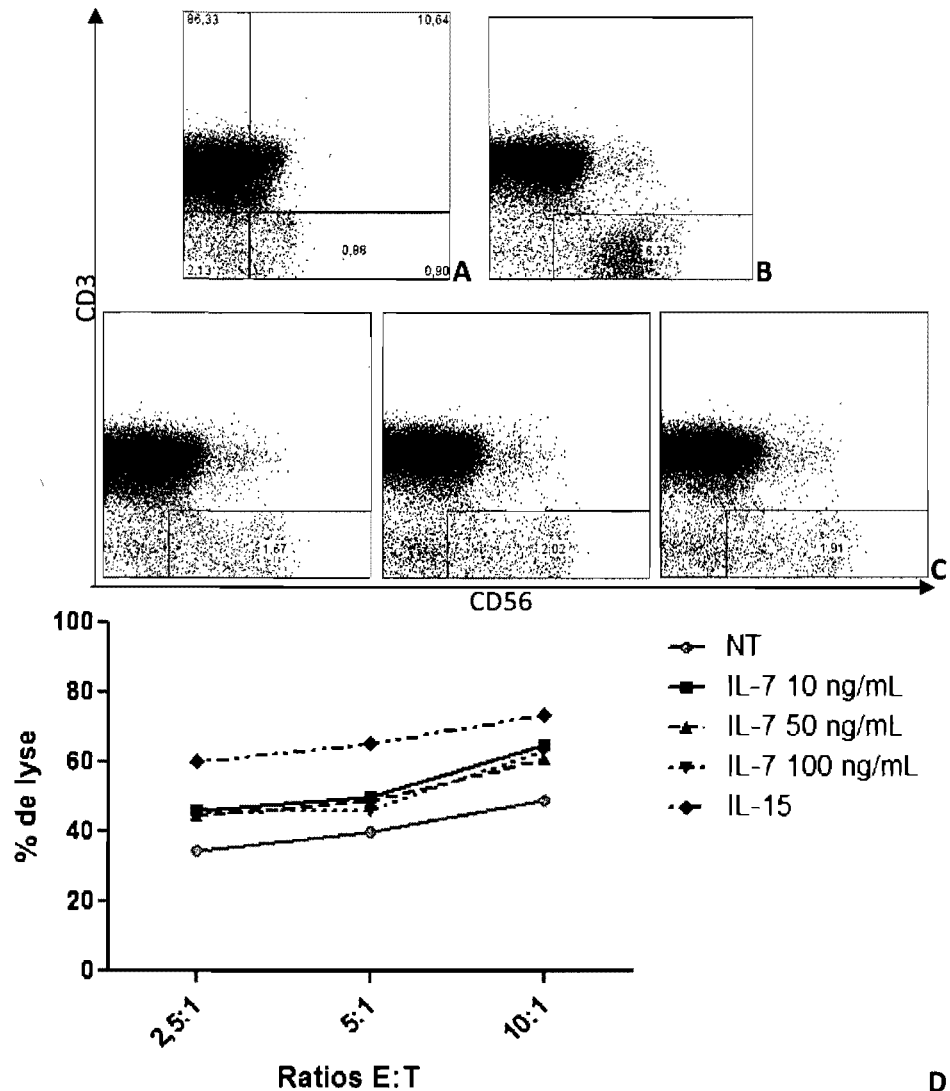
### **3.2.1. Phénotype**

#### 3.2.1.1. Optimisation

##### 3.2.1.1.1. *Concentration d'IL-7*

D'une cellule à l'autre tout comme d'une cytokine à l'autre, la concentration de cytokines pour un effet optimal varie. Pour cette raison, nous avons mesuré l'effet sur la survie sur des cellules NK en culture pendant 15 jours de plusieurs concentrations d'IL-7. Suite à une recherche dans la littérature sur les concentrations d'IL-7 utilisées pour stimuler d'autres types cellulaires, on a trouvé que les concentrations les plus communément utilisées étaient 10 ng/mL, 50 ng/mL et 100 ng/mL. Toutefois, les différences observées sur la population de cellules NK traitées avec l'IL-7 étaient faibles (figure 2 A et C) comparativement aux cellules traitées avec l'IL-15 (figure 2 B). Nous avons alors décidé de répéter l'expérience mais cette fois en termes d'activité cytotoxique induite. Une plus forte concentration n'augmente pas l'effet cytotoxique et nous avons alors décidé d'opter pour celle qui était la plus courante dans la littérature c'est-à-dire 10 ng/mL (figure 2D).



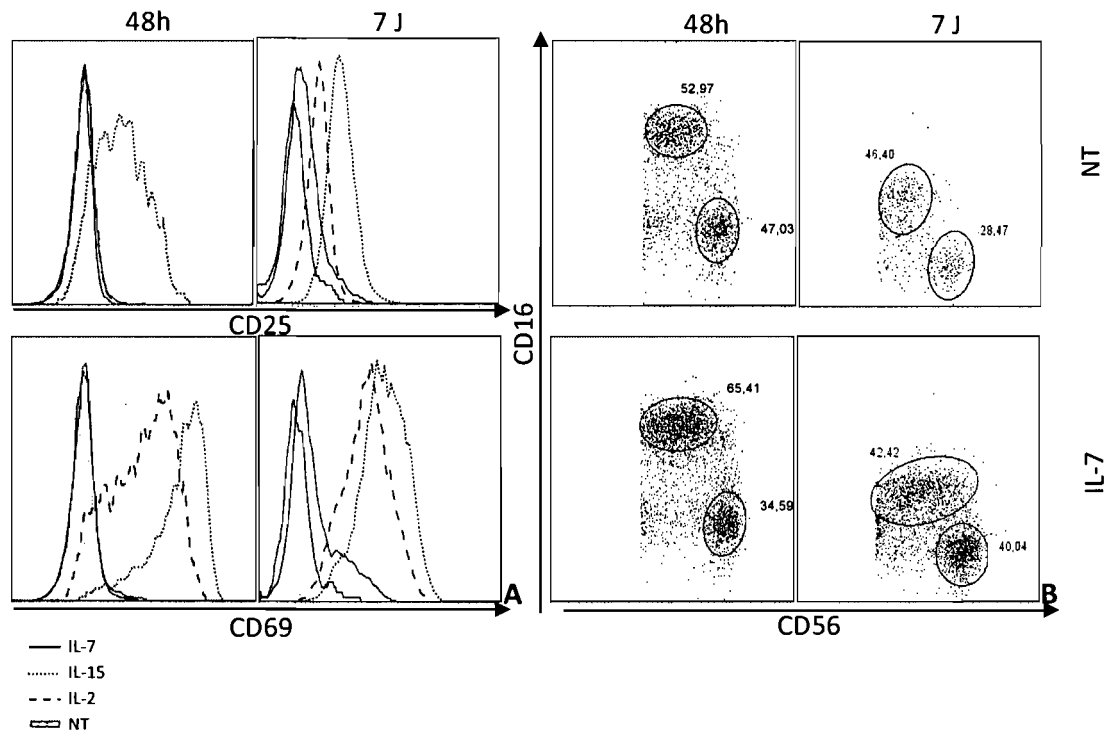


**Figure 2 : Influence de la concentration d'IL-7 sur les cellules NK.** Les PBMC totaux ont été mis en culture pendant 15 jours. Les lymphocytes ont d'abord été sélectionnés par leur rapport taille/granulosité (FSC/SSC). Puis les lymphocytes exprimant CD56 mais pas CD3 sont considérées comme étant des cellules NK. Les pourcentages représentent les cellules NK par rapport aux lymphocytes. **A** Cellules NK non traitées. **B** Cellules NK traitées avec l'IL-15. **C** À gauche, les cellules NK traitées avec 10 ng/mL d'IL-7, au centre, les cellules NK traitées avec 50 ng/mL d'IL-7 et à droite, les cellules NK traitées avec 100 ng/mL d'IL-7. **D** Cytotoxicité induite par différentes concentrations d'IL-7. En gris les cellules NK non traitées, la courbe pleine les cellules NK traitées avec 10ng/mL d'IL-7, en traits tirés, les cellules NK traitées avec 50 ng/mL d'IL-7, en traits et points tirés, les cellules NKK traitées avec 100 ng/mL d'IL-7 et en pointillés, les cellules NK traitées avec l'IL-15.

#### 3.2.1.1.2. Temps d'incubation

Afin de maximiser le potentiel de l'IL-7 sur les cellules NK, nous avons également évalué le temps auquel on notait un maximum d'effet. Nous avons évalué le temps nécessaire à l'induction d'un phénotype d'activation via l'induction de CD25 et CD69. L'IL-7 n'induit pas l'expression de CD25 et CD69 après 48h d'incubation comparativement aux témoins positifs que sont l'IL-15 et l'IL-2 (figure 3A).

Ainsi, il semblerait que l'IL-7 n'ait pas d'effet à 48h. Nous avons donc évalué le phénotype induit par l'IL-7 après sept jours de culture. Nous avons alors constaté que ces mêmes molécules d'activation que sont CD25 et CD69 sont alors exprimées (figure 3A). Nous croyons donc que pour le phénotype d'activation, les conditions optimales seraient après sept jours de culture. Il est intéressant de noter que la proportion  $CD56^{dim}/CD56^{bright}$  change après 7 jours de culture lorsque nous traitons avec l'IL-7 (figure 3B). En effet, chez les cellules non traitées, on retrouve 46 % de  $CD56^{dim}$  et 28% de  $CD56^{bright}$ . Chez les cellules traitées avec l'IL-7, on retrouve 42 % de  $CD56^{dim}$  et 40 % de  $CD56^{bright}$ . Comme l'IL-7 induit un effet plus important après 7 jours, nous avons choisi ce paramètre pour les essais suivants.

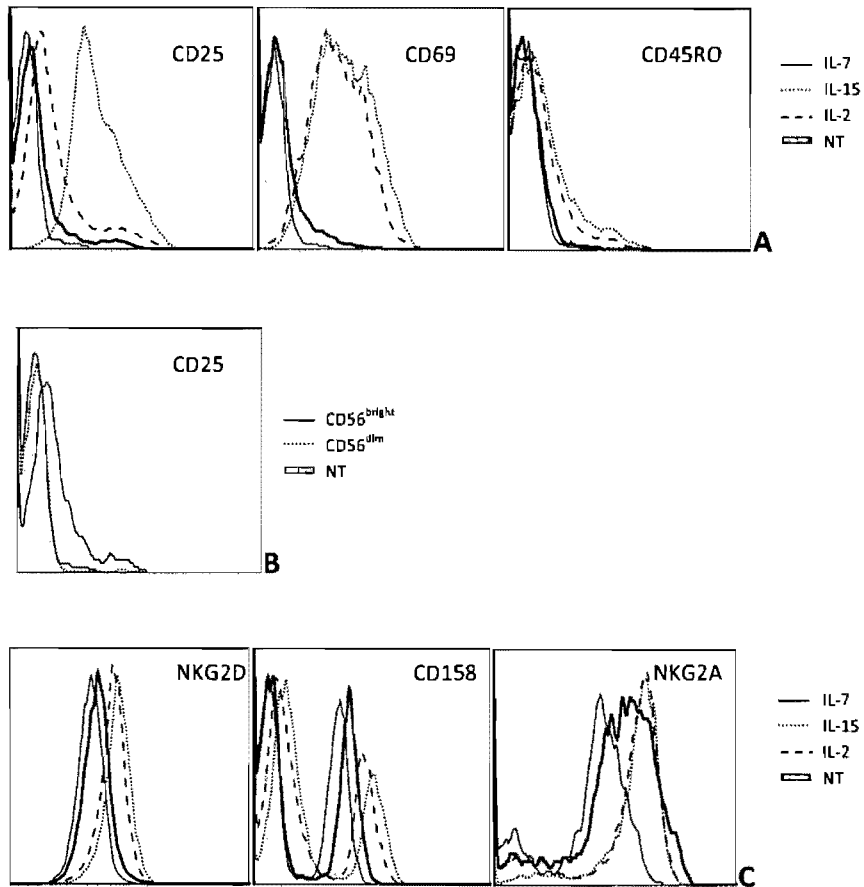


**Figure 3 : Effet de l'IL-7 à court terme et moyen terme. A** Phénotype induit par l'IL-7 après 48h et 7 jours de culture. Les lymphocytes ont d'abord été sélectionnés par leur rapport taille/granulosité (FSC/SSC), puis les lymphocytes exprimant CD56 mais pas CD3 sont considérées comme étant des cellules NK. La courbe colorée représente les NK non traités, la courbe en pointillée les NK traités par l'IL-15, la courbe en traits tirés les NK traités par l'IL-2 et la courbe pleine les NK traités par l'IL-7. **B** Évolution des sous-populations CD56<sup>dim</sup> et CD56<sup>bright</sup> suite à une stimulation de 48 heures et 7 jours avec l'IL-7. La figure du haut montre la différenciation de NK non traités. La figure du bas montre la différenciation de NK traités avec l'IL-7.

### 3.2.1.2. Marqueurs d'activation et récepteurs

Puisque nous avons pu déterminer les conditions nous permettant d'obtenir une activation des cellules NK par l'IL-7, nous avons comparé l'effet de 10 ng/mL et 7 jours de culture d'un sujet à l'autre. Les résultats qui suivent ont tous été réalisés sur sept sujets différents et nous avons évalué l'état d'activation des cellules NK dans les mêmes conditions. Pour ce faire, nous avons ajouté à l'expression des marqueurs d'activation (CD25 et CD69) un autre marqueur d'activation (CD45RO), l'expression du récepteur activateur NKG2D et l'expression des récepteurs inhibiteurs NKG2A et CD158 (KIR3D) afin d'avoir un schéma d'activation plus complet.

Nous avons d'abord vérifié l'effet de l'IL-7 sur les molécules d'activation des cellules NK. Les résultats montrent que suite à l'ajout d'IL-7, CD25 ainsi que CD69 (figure 4A) sont induits à de très faibles niveaux comparativement à ceux induits par l'IL-2 et l'IL-15. On ne retrouve aucune induction lorsqu'on observe CD45RO (figure 4A). Il est intéressant de remarquer que lors de l'induction de CD25 par l'IL-7, seules les cellules NK CD56<sup>bright</sup> expriment CD25 (figure 4B). Nous avons par la suite étudié l'effet de l'IL-7 sur les récepteurs d'activation et d'inhibition des cellules NK. Concernant les récepteurs d'activation, on observe une légère mais notable augmentation de NKG2D et CD158. Cette induction est encore une fois inférieure à celles induites par l'IL-2 et l'IL-15 (figure 4C). L'augmentation du récepteur d'inhibition NKG2A est toutefois plus marquée et comparable à celles induites par



**Figure 4 : Phénotype des cellules NK après 7 jours de culture.** Les résultats sont représentatifs de ceux obtenus à travers sept donneurs différents. Les lymphocytes ont d'abord été sélectionnés par leur rapport taille/granulosité (FSC/SSC), puis les lymphocytes exprimant CD56 mais pas CD3 sont considérées comme étant des cellules NK. La courbe colorée représente les NK non traités, la courbe en pointillée les NK traités par l'IL-15, la courbe en traits tirés les NK traités par l'IL-2 et la courbe pleine les NK traités par l'IL-7. **A** À gauche, l'expression de CD25 chez les cellules NK totales, au centre l'expression de CD69 et à droite, l'expression de CD45RO. **B** Expression de CD25 chez les deux sous-populations. La courbe pleine représente les cellules NK CD56<sup>bright</sup> et la courbe pointillée les cellules NK CD56<sup>dim</sup>. **C** Expression de NKG2D de CD158 et de NKG2A.

l'IL-2 et l'IL15 (figure 4C). Ainsi, l'IL-7 modifie les marqueurs d'activation des cellules NK après sept jours de culture.

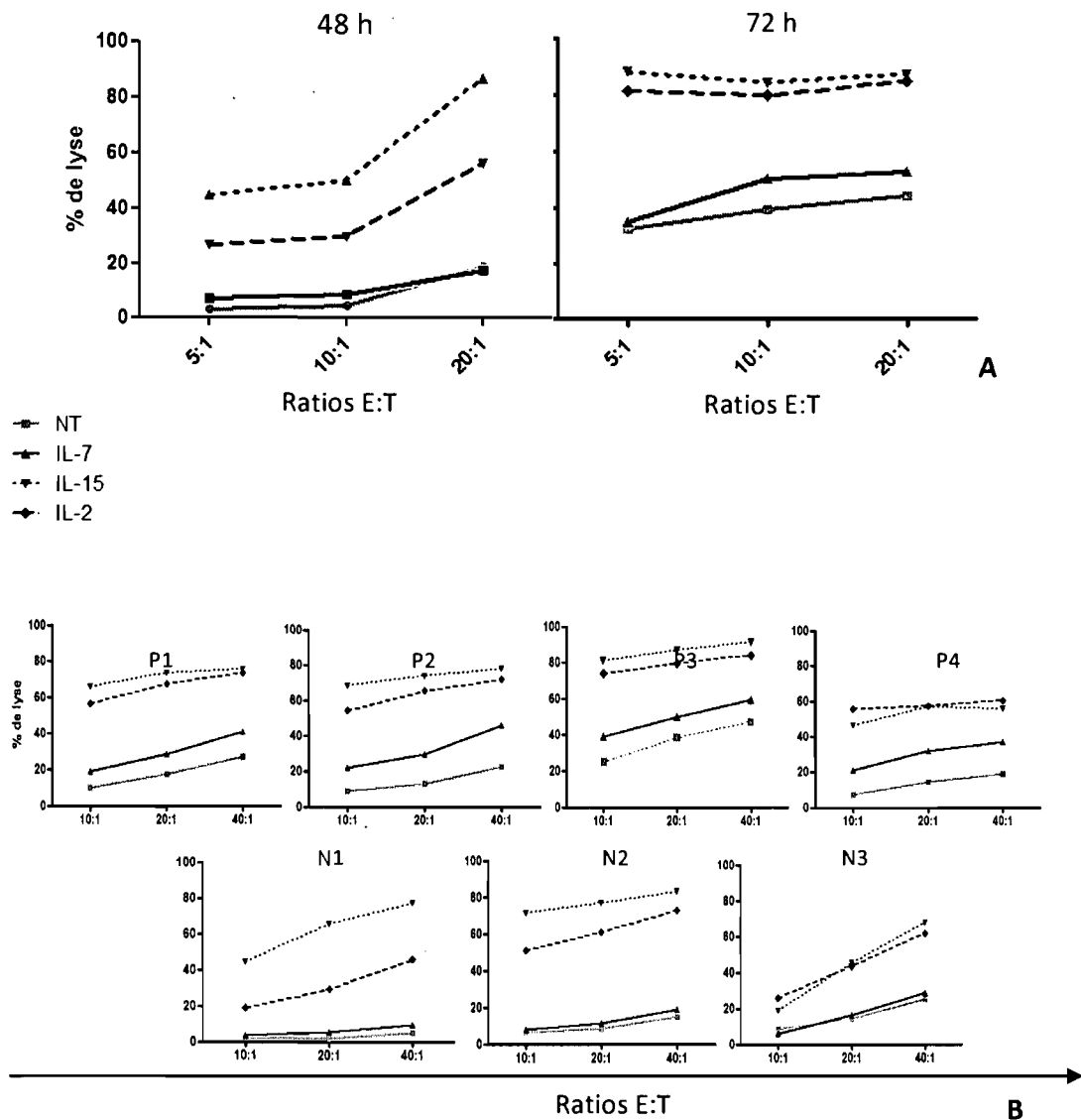
### **3.2.2. Fonction**

#### **3.2.2.1. Optimisation**

Nous avons d'abord essayé d'induire une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK par 10 ng/mL d'IL-7 et ce après 48 et 72 heures d'incubation. Nous n'avons observé aucune augmentation de la cytotoxicité induite par l'IL-7 lorsqu'on incubait pendant 48 heures contrairement à ce qui est observée avec l'IL2 et l'IL-15. Toutefois, on observait une augmentation de la cytotoxicité lorsqu'on augmentait ce temps d'incubation à 72h sans égaler toutefois l'effet induit par l'IL-2 ou l'IL-15 (figure 5A).

#### **3.2.2.2. Cytotoxicité induite**

Comme l'effet cytotoxique est un des effets principaux que nous cherchons à induire, nous avons évalué si l'induction par l'IL-7 est constante d'une personne à l'autre. Nous notons chez quatre de nos sept donneurs une augmentation de la cytotoxicité induite par l'IL-7. Ces augmentations restent toujours inférieures à celles induites par l'IL-2 ou l'IL15 (figure 5B). Ainsi, il semblerait que l'effet de l'IL-7 soit variable d'un donneur à l'autre. Il est à noter qu'il n'y avait aucune variation



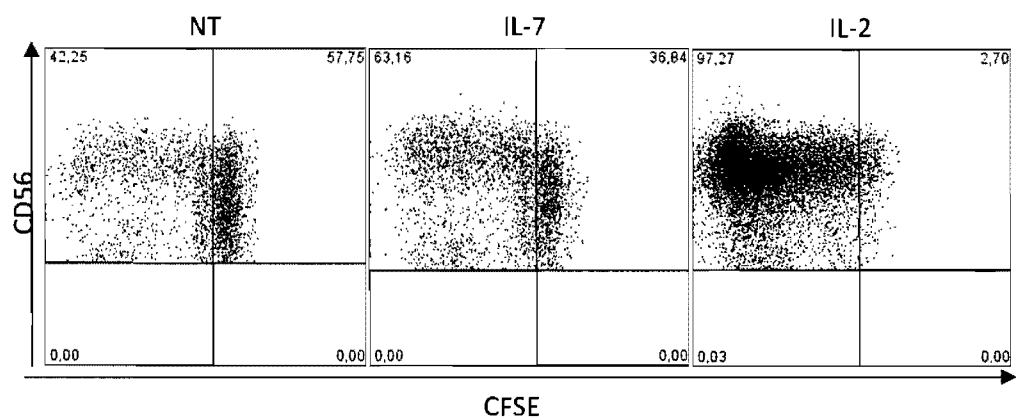
**Figure 5 : Cytotoxicité induite par l'IL-7.** Des PBMC ont été mis en culture pour éventuellement être mis en contact avec des K562 marqués au  $^{51}\text{Cr}$ . La courbe grise représente les PBMC non traités, la courbe en pointillée les PBMC traités par l'IL-15, la courbe en traits tirés les PBMC par de l'IL-2 et la courbe pleine les PBMC traités par l'IL-7. **A** Cytotoxicité induite par l'IL-7 après 48 heures de culture à gauche et 72h à droite. **B** Cytotoxicité induite par l'IL-7 après 72 heures de culture chez 7 donneurs différents. Les donneurs ont été classés selon qu'ils étaient positifs (P) ou négatifs (N) à une induction de la cytotoxicité par l'IL-7.

intra-individuelle dans le temps. De plus, le niveau d'expression de CD127 n'est pas corrélé avec l'induction ou non d'une cytotoxicité par l'IL-7.

### **3.2.3. Prolifération**

Puisque l'effet d'activation de l'IL-7 semble être maximal à 7 jours et variable d'un sujet à l'autre, nous avons testé l'effet de l'IL-7 sur la prolifération après de sept jours de culture. Les résultats montrent que l'IL-7 induit une prolifération modérée. En effet, celle-ci est restreinte à la sous-population de cellules NK CD56<sup>bright</sup> contrairement à une prolifération de la quasi-totalité des cellules NK induite par l'IL-2 (figure 6). Cette observation s'ajoute d'ailleurs à celle faite sur l'induction de CD25 chez les cellules NK CD56<sup>bright</sup> seulement.





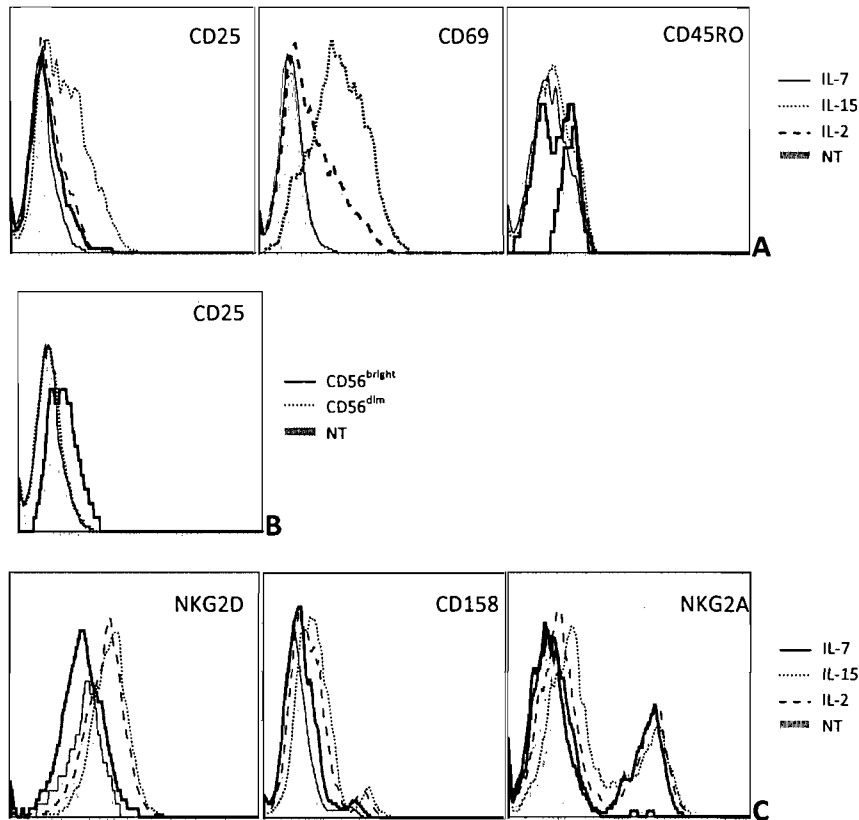
**Figure 6 : Induction par l'IL-7 d'une prolifération des cellules NK.** Les résultats sont représentatifs de ceux obtenus pour sept donneurs différents. Les lymphocytes ont d'abord été sélectionnés par leur rapport taille/granulosité (FSC/SSC), puis les lymphocytes exprimant CD56 mais pas CD3 sont considérées comme étant des NK. La figure de gauche représente les PBMC non traités, la figure du centre les PBMC traités avec l'IL-7 et la figure de droite les PBMC traités avec l'IL-2.

### **3.3. Effet de l'IL-7 sur les cellules NK purifiées**

Suite aux résultats observés sur des cellules NK en présence d'autres cellules, nous nous sommes demandés si l'effet observé sur les cellules NK est directement dû à un effet de l'IL-7. En effet, d'autres types cellulaires parmi les PBMC peuvent être influencés par l'IL-7. Il est connu que les lymphocytes T et les NKT expriment le récepteur de l'IL-7 et produisent, entre autre, de l'IFN- $\gamma$  sous une stimulation à l'IL-7. Nous avons donc refait les mêmes séries d'essais avec les mêmes donneurs mais cette fois sur des cellules NK purifiés.

#### **3.3.1. Phénotype**

Lorsque nous regardons les marqueurs d'activation, nous remarquons que seul CD25 a été induit et ce sur les cellules NK CD56<sup>bright</sup> seulement, comme chez les cellules NK parmi les PBMC (figure 7B). CD69 et CD45RO (figure 7A) ne voient pas leur expression induite par l'IL-7. Chez les cellules NK parmi les PBMC, l'expression de ces marqueurs était faible ou nulle. Aucun effet n'est remarqué quand à l'expression de NKG2D contrairement à nos témoins positifs (figure 7C), NKG2D n'était que faiblement exprimé chez les cellules NK parmi les PBMC. On remarque une augmentation de CD158 toutefois plus faible que celles induites par l'IL-2 et l'IL15 (figure 7C). Cette augmentation d'expression de CD158 induite par l'IL-7 sur

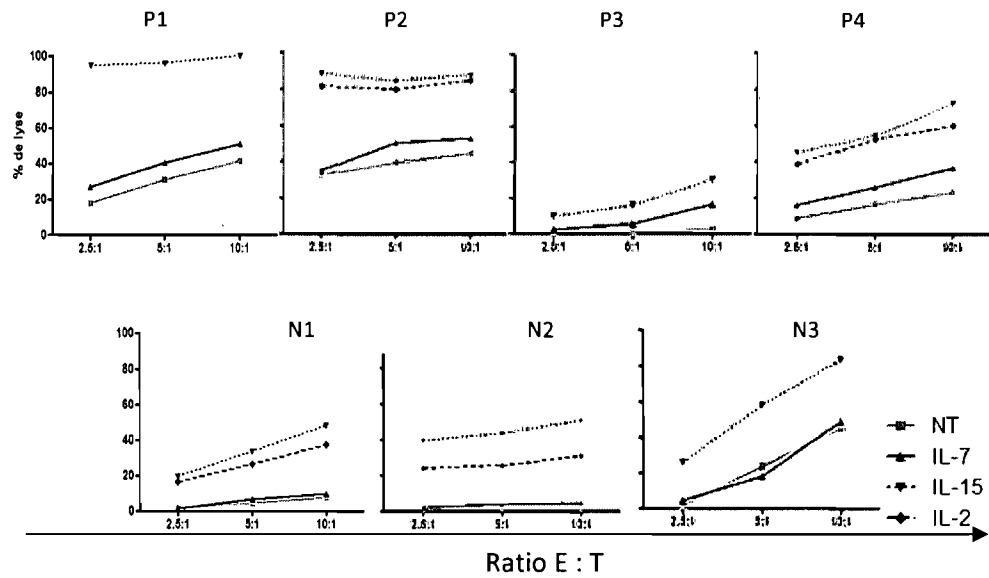


**Figure 7: Phénotype des cellules NK purifiées après 7 jours de culture.** Les résultats sont représentatifs de ceux obtenus à travers sept donneurs différents. La courbe colorée représente les NK non traités, la courbe en pointillée les NK par de l'IL-15, la courbe en traits tirés les NK par de l'IL-2 et la courbe pleine les NK traités par l'IL-7. **A** À gauche, l'expression de CD25, au centre l'expression de CD69 et à droite l'expression de CD45RO. **B** Expression de CD25 chez les sous-populations. La courbe pleine représente les cellules NK CD56<sup>bright</sup> et la courbe pointillée les cellules NK CD56<sup>dim</sup>. **C** À gauche, l'expression de NKG2D, au centre, l'expression de CD158 et à droite, l'expression de NKG2A.

les cellules NK isolées est également plus faible que celle induite par l'IL-7 sur les NK en présence des autres PBMC. Concernant NKG2A, on remarque que l'IL-7, comme l'IL-2 et l'IL-15, permet le maintien de son expression puisque les cellules NK non traitées perdent l'expression de NKG2A (figure 7C).

### **3.3.2. Fonction**

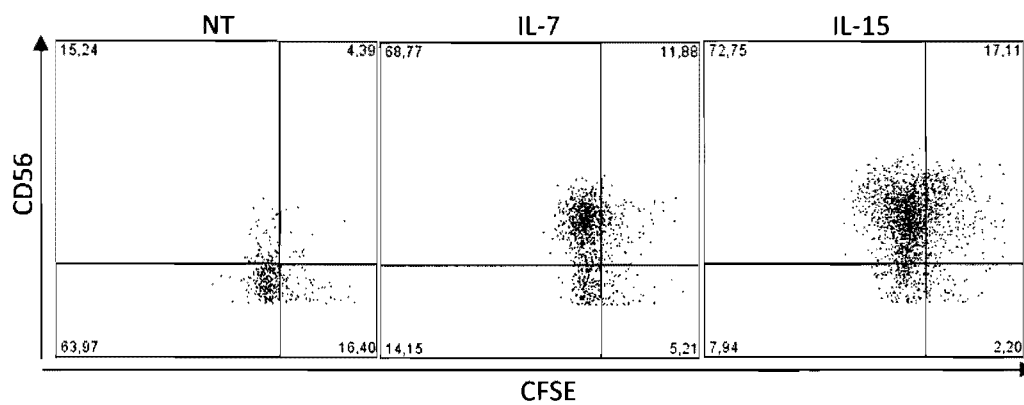
Concernant le test de cytotoxicité, nous observons que la cytotoxicité induite est plus faible lorsque les cellules NK sont purifiées. Les donneurs ayant répondu lorsque les cellules NK n'étaient pas purifiées répondent : ainsi, quatre de nos sept donneurs voient augmenter leur cytotoxicité alors que les trois autres ne réagissent pas (figure 8).



**Figure 8 : Cytotoxicité induite par l'IL-7 sur des cellules NK purifiées en culture pendant 72 heures.** Les figures représentent respectivement les mêmes donneurs que pour la figure 2A. Des cellules NK purifiées ont été mises en culture pour éventuellement réagir avec des K562 marqués au  $^{51}\text{Cr}$ . La courbe grise représente les PBMC non traités, la courbe en pointillée les PBMC traités par l'IL-15, la courbe en traits tirés les PBMC traités par l'IL-2 et la courbe pleine les PBMC traités par l'IL-7.

### 3.3.3. Prolifération

Lors d'essais effectués sur des PBMC, il a été très évident que l'IL-7 induisait une prolifération importante des cellules NK CD56<sup>bright</sup> seulement. En général, les résultats ont été assez difficiles à obtenir puisque la méthode demande une très grande quantité de cellules, ce qui est rarement le cas lors d'une purification des cellules NK. Nous avons réussi à obtenir un nombre suffisant de cellules pour quelques uns de nos donneurs et les résultats concordent d'une fois à l'autre. Nous pouvons donc observer que l'IL-7 n'induit pas de prolifération. Cependant, on observe une tendance à infléchir le rapport CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> vers les cellules NK CD56<sup>bright</sup>. En effet, 64 % des cellules NK non traitées sont des CD56<sup>dim</sup> contre 15 % pour les CD56<sup>bright</sup>. Lorsqu'on traite avec l'IL-7, nous obtenons que 14 % de CD56<sup>dim</sup> contre 69 % de CD56<sup>bright</sup>, chiffres comparable à la représentation des sous-populations après un traitement à l'IL-15 (figure 9).

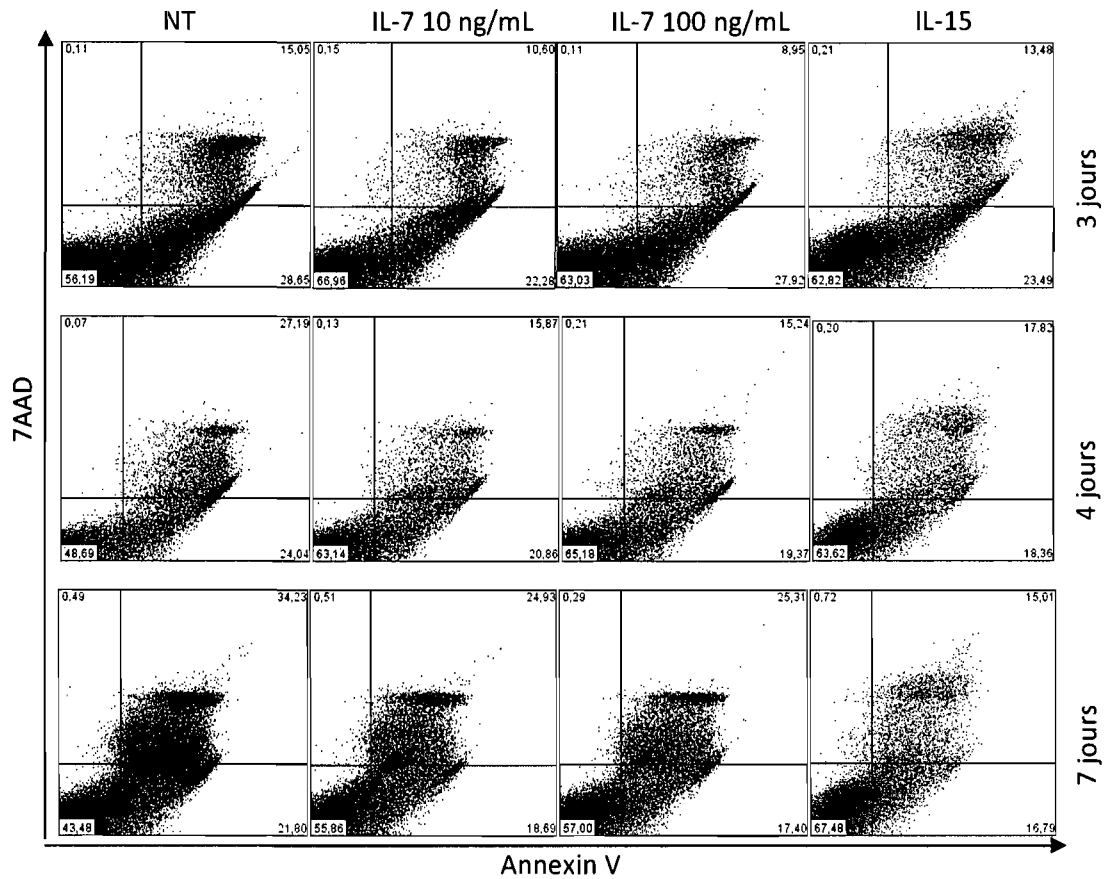


**Figure 9 : Induction par l'IL-7 de la prolifération des cellules NK purifiées.** La figure de gauche représente les cellules NK non traitées, la figure du centre les cellules NK traitées par l'IL-7 et la figure de droite les cellules NK traitées par l'IL-15.

#### **3.3.4. Apoptose**

Le test d'apoptose n'a pas été effectué de façon classique, c'est-à-dire après 48 et 72h de culture. En effet, les tests classiques d'apoptose visent à apprécier l'induction d'une apoptose par le composé testé. Ici, nous voulions au contraire évaluer la diminution d'apoptose induite par les cytokines. Nous observons premièrement l'IL-7 et l'IL-15 diminuent la proportion de cellules en apoptose, en comparaison avec les cellules non traitées. On note que l'effet de l'IL-7 ne change pas d'une concentration à l'autre (10 vs 100 ng/ml). De plus, à 3 et 4 jours, l'IL-7 a un effet aussi important que l'IL-15, soit une réduction de moitié du pourcentage de cellules en apoptose. Finalement, après 7 jours, la réduction du pourcentage de cellules en apoptose est moins marquée avec l'IL-7 qu'avec l'IL-15 : 34 % d'apoptose en l'absence de cytokine, 15 % avec l'IL-15, et 24 % avec l'IL-7. (figure 10).





**Figure 10 : Expression des marqueurs d'apoptose et de nécrose chez de cellules NK purifiées.** En FSC et SSC, seuls les débris ont été exclus de la sélection. La sélection a été évaluée via les marqueurs l'Annexin V et le 7AAD. De gauche à droite, les cellules NK non traitées, traitées avec 10 ng/mL, traitées avec 100 ng/mL et traitées avec l'IL-15. De haut en bas, l'apoptose a été testée après 3, 4 et 7 jours de culture. La survie peut être évaluée via le pourcentage de cellules doubles négatives. La pureté des cellules NK était de plus de 95%.

### 3.3.5. Production d'IFN- $\gamma$

Puisque que nous détectons un effet de l'IL-7 particulièrement sur les CD56<sup>bright</sup>, il devenait normal de vérifier si l'IL-7 induit la production d'IFN- $\gamma$ . Nous avons donc dosé la production d'IFN- $\gamma$  par ELISA. Les résultats montrés représentent deux donneurs différents : un premier pour lequel l'IL-7 a induit une cytotoxicité (P1) et un deuxième pour lequel l'IL-7 n'a pas induit de cytotoxicité (N2, voir Figure 8). L'IL-2 induit une forte production de cytokines et nous l'avons donc choisi comme contrôle positif. On voit que l'IL-7 n'a que très faiblement d'influence sur la production d'IFN- $\gamma$  et ce seulement chez le donneur pour lequel l'IL-7 a induit une cytotoxicité des NK (tableau I).

**Tableau I : Production d'IFN- $\gamma$  (pg/mL) induite par l'IL-7**

	Non traitées	IL-7	IL-2
P2	45,38	72,84	937,97
N1	54,53	63,69	100,3

**Légende** : P2 est un donneur dont la cytotoxicité des cellules NK est augmentée par l'IL-7. N1 est un donneur dont la cytotoxicité des cellules NK n'est augmentée par l'IL-7 (voir Figure 5).

### **3.4. Effet de l'IL-7 sur les sous-populations de cellules NK**

Nous avons montré précédemment que l'IL-7 semblait influencer le sous-type cellulaire d'une population générale de cellules NK purifiées. Sans nécessairement influencer la représentation des sous-populations, déjà après 48 heures de culture avec de l'IL-7, nous avons remarqué une plus grande survie des cellules NK que lorsqu'il n'y avait aucun traitement. Puis, après sept jours de culture avec l'IL-7, nous avons aussi remarqué que cet effet de l'IL-7 était surtout sur les cellules NK CD56<sup>bright</sup>. De ces faits, nous avons donc établi les proportions des sous-populations sans traitement et avec IL-7. Le tableau II montre que chez les cellules NK parmi les PBMC, non seulement plus de cellules survivent mais le pourcentage de cellules NK CD56<sup>bright</sup> augmente drastiquement. De plus, cette augmentation est encore plus marquée lorsque les cellules NK sont purifiées (tableau III). Il est aussi à remarquer que malgré que nous n'ayons pas noté de différences notables entre les différentes concentrations d'IL-7 pour les résultats des cellules NK parmi les PBMC, le nombre de cellules NK double lorsque des cellules NK purifiées sont stimulées par 100 ng/mL d'IL-7 par rapport à un traitement de 10 ng/mL d'IL-7 et quadruple par rapport au cellules NK non traitées (tableau III).

**Tableau II : Effet de l'IL-7 sur le nombre de cellules NK parmi des PBMC**

Traitement	Nbre de NK	% CD56 <sup>Bright</sup>	% CD56 <sup>Dim</sup>
NT	2100	19,05	80,95
IL-7 (10 ng/mL)	3400	52,94	47,06

**Légende :** NT représente les cellules non traitées. Les données ont été récoltées après 7 jours de culture.

**Tableau III : Effet de l'IL-7 sur le nombre de cellules NK purifiées**

Traitement	Nbre de NK	% CD56 <sup>Bright</sup>	% CD56 <sup>Dim</sup>
NT	2804	6,7	80,37
IL-7 (10 ng/mL)	5672	73,24	16,81
IL-7 (100 ng/mL)	10 081	71,63	19,87

**Légende :** NT représente les cellules non traitées. Les données ont été récoltées après 7 jours de culture. Les données en termes de nombre de cellules ont été récoltées sur un seul sujet. Toutefois, les pourcentages de CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> sont représentatifs de tous les autres sujets.

#### 4. DISCUSSION

L'IL-7 a premièrement été décrite comme étant essentielle à l'hématopoïèse des précurseurs lymphocytaires. On réalise maintenant que l'IL-7 ne se restreint pas seulement à un rôle dans l'hématopoïèse, mais également dans la différenciation et le maintien de sous-populations lymphocytaires. On sait aussi que l'IL-7 induit une activité cytotoxique chez les lymphocytes T (Alderson *et al*, 1990; Carini *et al*, 1994). L'IL-7 est actuellement utilisée pour stimuler la régénération d'un système immunitaire et ce, dans deux contextes différents : la régénération d'un système immunitaire chez des souris immunodéficientes (Leonard D. Shultz *et al* 2005) et l'utilisation thérapeutique suite à une greffe de moelle osseuse (Alpdogan *et al*, 2001). Toutefois, ces études avaient comme objectifs la reconstitution immunitaire en général et l'effet de l'IL-7 sur la reconstitution des lymphocytes T, sans s'attarder sur l'effet sur les cellules NK. Ce n'est toutefois pas très surprenant puisque jusqu'à tout récemment, l'effet de l'IL-7 sur les cellules NK était très peu connu. On sait qu'une grande concentration d'IL-7 peut induire une cytotoxicité des cellules NK, mais peu de cytokines sont ainsi produites. De plus, une revue présentait le rôle de l'IL-7 sur les cellules NK comme étant limité à la lymphopoïèse sans effet sur les cellules NK matures (Collucci *et al* 2003). Récemment, il a été montré chez la souris que, la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7 n'est exprimée que chez les cellules NK CD56<sup>bright</sup> ayant mûri dans le thymus. Les résultats préliminaires de la même équipe semblent montrer la même chose chez l'humain (Vosshenrich *et al*, 2006).

## **4.1. Le récepteur de l'IL-7**

### **4.1.1. Expression de CD127**

#### **4.1.1.1. Cellules NK thymiques**

Il a été mentionné précédemment qu'une équipe a montré l'expression de CD127 sur les cellules NK humaines. Leur conclusion est que CD127 n'est présent que sur les NK ayant eu une maturation thymique. De plus, ils montraient que seuls les CD56<sup>bright</sup> exprimaient CD127. Ces résultats avaient été obtenus à partir de sang périphérique d'adulte sain (Vosshenrich et al, 2006). Toutefois, il est important de noter qu'ils ont d'abord étudié la présence de CD127 chez la souris. Ils ont pu démontrer chez la souris que seules les cellules NK ayant eu une maturation thymique expriment CD127. Ils ont ensuite tenté de vérifier si ces résultats étaient reproductibles chez l'Homme. Ils ont d'abord montré qu'une partie des cellules NK présentes dans le thymus humain expriment CD127. En comparant leur résultats sur les NK périphériques à ceux sur des NK provenant d'un thymus d'enfant prélevé lors d'une chirurgie cardiaque, ils concluent que les cellules NK périphériques exprimant CD127 sont des cellules NK ayant eu une maturation thymique. Or, les seules conclusions que l'on peut tirer des résultats présentés sont que certaines cellules NK présentes dans le thymus expriment faiblement CD127 et que les cellules NK périphériques CD56<sup>bright</sup> expriment également partiellement CD127. La restriction du CD127 aux cellules NK ayant subi une maturation thymique est certaine chez la souris, mais douteuse chez l'Homme.

Comme nos résultats divergent de ceux de Vosshenrich *et al*, nous avons cherché les différences techniques entre les deux équipes. Nous avons alors constaté que nous n'avions pas utilisé le même anticorps. En comparant le marquage des deux anticorps, nous avons constaté que l'anticorps que nous avons utilisé, le hIL-7R M21, marque les cellules avec une fluorescence plus importante que l'autre anticorps (40131) (figure 1C). Ainsi, nous avons obtenu un résultat clairement positif pour les deux sous-populations CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup>. De plus, nous avons vérifié l'expression de CD127 chez un patient n'ayant pas de thymus (souffrant d'un Di George complet). La présence de CD127 sur les cellules NK de ce patient confirme que, chez l'Homme, l'expression de CD127 n'est pas restreinte aux cellules NK ayant mûri dans le thymus.

#### 4.1.1.2. Expression de CD127 sur les cellules NK CD56<sup>bright</sup>

Le marquage des cellules NK pour CD127 montre une différence entre les deux sous-populations : la sous-population de cellules NK CD56<sup>bright</sup> exprime beaucoup plus fortement CD127 (anticorps hIL-7R-M21) que les CD56<sup>dim</sup>. L'incubation avec l'IL-7 ne modifie pas l'expression de CD127 sur les CD56<sup>dim</sup>. Par contre, cette incubation fait diminuer l'expression de CD127 sur les CD56<sup>bright</sup> à la valeur observée chez les CD56<sup>dim</sup> (figure 1 E). Cela suggère que le récepteur complet (chaînes  $\alpha$  et  $\gamma_c$ , CD127-CD132), seul capable de fixer l'IL-7, est présent sur les cellules NK CD56<sup>bright</sup>, mais sur les CD56<sup>dim</sup> (Leonard *et al*, 1994;Lai *et al*, 1997). L'anticorps utilisé par

Vosshenrich (40131) se fixe aux CD56<sup>bright</sup> et aux CD56<sup>dim</sup> avec la même intensité de fluorescence (figure 1D), et cette intensité de fluorescence est comparable à celle obtenue par l'anticorps hIL-7R-M21 sur les CD56<sup>dim</sup>. Une explication de ces données pourrait être que l'anticorps 40131 reconnaît un épitope de CD127 non accessible lorsque celui-ci forme un dimère avec la chaîne  $\gamma_c$ , tandis que l'anticorps hIL-7R-M21 reconnaît un épitope de CD127 demeurant accessible que CD127 soit lié à la chaîne  $\gamma_c$  ou non. Cette hypothèse suppose que CD127 puisse être exprimé seul, ou en association avec une autre molécule que la chaîne  $\gamma_c$ . La possibilité pour CD127 d'être exprimé seul n'a pas été étudiée dans la littérature. Toutefois, il est connu pour d'autre récepteur de cytokines que les chaînes peuvent être exprimées seules : le récepteur de l'IL-2 en est un exemple (Leonard, 1996). De plus l'expression de CD127 avec un autre partenaire que la chaîne  $\gamma_c$  est attestée : CD127 est également la chaîne  $\alpha$  du récepteur au TSLP (Leonard, 2002).

#### **4.1.2. Polymorphisme**

La différence d'induction de cytotoxicité par l'IL-7 d'un individu à l'autre est pour l'instant difficilement explicable. En effet, l'expression de CD127 dans chacune des sous-populations est identique d'un volontaire à l'autre. Ainsi il n'y a pas non plus de lien entre les réponses fonctionnelles à l'IL-7 et le niveau d'expression de CD127. Bien que peu d'information soit disponible sur le polymorphisme de CD127 et son effet sur la transmission de signal, il existe un polymorphisme au niveau de la



partie extracellulaire de la chaîne  $\alpha$  du récepteur (Shamin *et al*, 2006), ce qui pourrait nous laisser croire que certaines conformations pourraient diminuer l'affinité du récepteur envers la cytokine. Ainsi, à expression membranaire égale, l'efficacité de la transduction du message pourrait changer.

#### 4.1.3. Affinité

L'affinité du récepteur pour l'IL-7 n'est pas complètement décrite dans la littérature à l'exception d'un article dont les résultats suggèrent que le récepteur pourrait avoir des affinités différentes envers son ligand (Page *et al*, 1993). Nous pouvons toutefois nous baser sur les connaissances acquises pour d'autres cytokines pour bâtir nos hypothèses. Prenons l'exemple de l'IL-2, membre de la famille  $\gamma_c$ . Premièrement, son récepteur est formé de trois chaînes :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma_c$  (figure 3 de l'introduction). Le récepteur peut donc se trouver à la surface de la cellule sous trois formes différentes que sont la chaîne  $\alpha$  seule, un dimère des chaînes  $\beta$  et  $\gamma_c$ , ou les trois chaînes réunies. Ces différentes formes ont chacune une affinité différente envers l'IL-2. La chaîne  $\alpha$  seule est la forme ayant la plus faible affinité avec l'IL-2, le complexe  $\beta$  et  $\gamma_c$  possède une affinité intermédiaire et les trois chaînes réunies présentent une forte affinité. Chez les cellules NK, on retrouve une affinité intermédiaire, ce qui explique en partie une activation souvent un peu plus faible que celle induite par l'IL-15 (Leonard, 1996; Taniguchi, 1995). De plus, chaque chaîne

a un rôle spécifique à jouer dans la transduction de messages. De cette façon, chaque complexe induit un message différent (Kim *et al*, 2006).

Considérant ces faits, nous pouvons penser que la relation entre l'IL-7 et son récepteur n'est pas si différente de celle entre l'IL-2 et son récepteur. Selon notre hypothèse, le récepteur complet de l'IL-7 ne serait présent que chez les cellules NK CD56<sup>bright</sup>. Ainsi, seule CD127 serait présente sur les CD56<sup>dim</sup>, ce qui pourrait engendrer, comme pour l'IL-2, une plus faible affinité et une plus faible, et probablement différente, transduction de message. Ce serait pour cette raison qu'on n'observe pas ou peu de modulation de CD127 sur la sous-population CD56<sup>dim</sup>. Pour les raisons mentionnées ci-haut, il est aussi possible que l'IL-7 puisse se lier à la chaîne  $\alpha$  seule chez les cellules NK CD56<sup>dim</sup> et induire une réponse complètement différente de celle induite chez les CD56<sup>bright</sup> et que nous ne l'ayons de ce fait pas observée.

## **4.2. IL-7 et fonction des cellules NK**

### **4.2.1. Activité cytotoxique**

Les études précédentes sur l'effet de l'IL-7 sur les cellules NK montraient une augmentation de l'activité cytotoxique à de fortes concentrations, soit entre 50 et 1000 ng/mL. 10 ng/mL est toutefois la concentration principalement utilisée lors des études avec les lymphocytes T. À cette concentration, une très faible activité

cytotoxique des cellules NK avait été détectée dans la littérature. Bien que dans la littérature, une concentration plus forte ait montré une plus grande survie des cellules NK purifiées, cette concentration n'a eu aucun effet sur les donneurs n'ayant pas répondu et n'a pas non plus augmenté l'efficacité de la réponse chez ceux qui avaient répondu. Ainsi, nos résultats vont à l'encontre de ceux présentés dans la littérature. En examinant de près les méthodes utilisées par les équipes ayant publié ces résultats, nous pouvons mettre en doute la qualité de la purification qu'ils avaient alors effectuée. Une de ces études a montré que l'IL-7 induit une forte augmentation de la cytotoxicité (Lum *et al*, 2004). Toutefois, leur purification a été effectuée par une sélection positive via CD16. Or, lorsqu'un anticorps se lie à CD16, ce récepteur engendre un processus d'activation de la cellule NK (Hulett & Hogarth, 1994). Nous croyons donc que l'activité des cellules NK purifiées contre des K562 est surtout due à l'activation des cellules via CD16 et non à l'IL-7. Toutefois, lorsqu'on regarde leurs figures montrant la différence entre les cellules NK non traitées et celles traitées avec l'IL-7, on note une différence d'induction de cytotoxicité qui ne devrait pas exister si l'effet cytotoxique n'était dû qu'à l'activation via CD16. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le traitement à l'IL-7 d'une cellule NK déjà activée engendre une activité cytotoxique aussi forte que celle engendrée par l'IL-15.

D'autres équipes ont effectué leur purification en sélectionnant les cellules CD56 positives. Or, nous savons aujourd'hui que cette purification n'exclut pas les cellules

NK portant un récepteur de cellules T (cellules NKT)(Naume & Espevik, 1991;Naume *et al*, 1992). Ces cellules NKT sont maintenant connues pour non seulement exprimer le récepteur à l'IL-7, mais également pour produire une quantité appréciable d'INF- $\gamma$ , de fait supérieure à ce que produisent les cellules T dans de mêmes conditions (Lin *et al*, 2004;Van der Vliet *et al*, 1999;Naume & Espevik, 1991;Naume *et al*, 1992)). Nous croyons donc que l'effet de l'IL-7 observé par ces équipes est en fait indirect, agissant d'abord sur les cellules NKT qui à leur tour stimulent les cellules NK. Nous croyons également que la différence entre la cytotoxicité des cellules NK parmi les PBMC et celle des cellules NK purifiées pourrait être due à cette influence en plus de celle des lymphocytes T. En effet, nos résultats nous ont montré une activité cytotoxique plus faible chez les cellules NK purifiées. Cette différence nous laisse donc croire que l'effet observé chez les cellules NK parmi les PBMC ne serait pas complètement dû à un effet de l'IL-7 directement sur les cellules NK. Ainsi, l'effet direct de l'IL-7 sur les cellules NK est en réalité faible au niveau de l'activation. C'est pourquoi nous n'observons qu'une faible réponse au niveau du phénotype des cellules NK purifiées. Aussi, cette réponse n'existe que pour des marqueurs ou récepteurs pour lesquels la réponse chez les cellules NK non purifiées était la plus forte.

Une étude a rapporté une induction de l'activité cytotoxique des cellules NK par l'IL-7 plus importante que celle que nous observons. Ces résultats ne sont pas en contradiction avec les nôtres. D'une part ces auteurs ont montré que les cellules NK

CD56<sup>bright</sup> sont les seules responsables de l'activité induite par l'IL-7 (Dadmarz *et al*, 1994). D'autre part, ils ont réalisé leurs expériences de cytotoxicité en séparant les cellules CD56<sup>bright</sup> et les cellules CD56<sup>dim</sup>. De notre côté, nous avons utilisé des cellules NK non séparées et, puisque les CD56<sup>bright</sup> représentent environ 10 % des cellules NK, le rapport effecteur sur cible des CD56<sup>bright</sup> était en moyenne 10 fois plus faible dans nos expériences que dans celles de Dadmarz *et al*.

#### 4.2.2. Production d'IFN- $\gamma$

Comme l'IL-7 semblait avoir un effet principalement sur les cellules NK CD56<sup>bright</sup>, nous nous attendions à détecter une forte production d'IFN- $\gamma$  à la suite d'une stimulation par l'IL-7. Or, ce ne fut pas le cas puisque nous retrouvons une faible production chez un volontaire et aucune production chez l'autre et ce malgré une pureté des cellules NK très élevée chez les deux volontaires. Toutefois, le donneur ayant produit une faible quantité d'IFN- $\gamma$  est aussi un donneur ayant présenté une activité cytotoxique. De son côté, le donneur n'ayant pas montré de production d'IFN- $\gamma$  n'avait pas présenté d'augmentation de cytotoxicité. Il semble donc que le mécanisme d'activation ait été induit, mais faiblement. Il devient donc intéressant de croire que cette faible activation n'est en fait due qu'à une faible représentation des CD56<sup>bright</sup> par rapport à toute la population de cellules NK autant au niveau de l'intensité des résultats observés que de la quantité d'IL-7 accessible pour cette sous-population. En effet, si une interaction a lieu avec CD127 seule chez les cellules

NK CD56<sup>dim</sup>, une plus faible quantité d'IL-7 a la chance d'interagir avec les CD56<sup>bright</sup> et, donc, l'effet est plus faible. Ainsi, en purifiant et en séparant les deux sous-populations, on pourrait sans doute répondre au moins en partie à cette question.

#### 4.2.3. Prolifération

Si l'IL-7 semble exercer un effet faible mais direct sur les cellules NK, il est intéressant de remarquer que les effets physiologiques concordent avec notre hypothèse selon laquelle CD127 est fonctionnelle chez les cellules NK CD56<sup>bright</sup>. En effet, nos tests de prolifération sur les cellules NK purifiées et non purifiées montrent que seules les cellules NK CD56<sup>bright</sup> prolifèrent sous stimulation de l'IL-7. De plus, l'IL-7 n'induit l'expression de CD25 que chez les cellules NK CD56<sup>bright</sup>. Finalement, les chiffres confirment nos observations en montrant une nette augmentation du ratio CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup>, de fait plus marquée chez les cellules NK purifiées. Cette propriété de l'IL-7 est d'ailleurs confirmée par la littérature. De plus, comme Dadmarz et ses associés, nous remarquons une différence au niveau de l'effet induit par l'IL-7 sur l'activité des cellules NK et leur prolifération. De plus, une autre équipe avait préalablement démontré que l'induction d'une prolifération était indépendante et plus tardive que l'induction d'une activation (Ramsdell *et al*, 1988).

#### 4.2.4. Survie

Nous avons vérifié la survie des cellules NK induite par l'IL-7 en testant le niveau de mort cellulaire induit par chacun de nos traitements. En comparant avec les cellules non traitées, nous pouvons affirmer que l'IL-7 induit une plus longue survie des cellules NK à une concentration de 100 ng/mL (figure 10), ce qui est confirmé par les chiffres du tableau III montrant que deux fois plus de cellules NK survivaient après sept jours de culture lorsqu'elles étaient traitées avec 100 ng/mL d'IL-7. Il est également intéressant de constater que cette survie et la prolifération ne sont dues qu'aux CD56<sup>bright</sup>. Ces données renforcent l'idée que la quantité d'IL-7 nécessaire varie selon l'effet recherché.

Il a été mentionné plus tôt que nous avons observé une tendance de l'IL-7 à favoriser le maintien de la population de cellules NK. Chez les cellules T, il est déjà connu que ce mécanisme s'effectue via Bcl2 (Mazzucchelli & Durum, 2007) et des évidences du même type ont été montrées sur des CD56 positives (donc incluant les NKT) (Armant *et al*, 1995). Malgré le fait que l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15 exercent une partie de leur action par une même chaîne, la chaîne  $\gamma_c$  (Ma *et al*, 2006) il est intéressant de constater que l'IL-15, de son côté, induit une survie des NK via Mcl-1 (Huntington *et al*, 2007). Ainsi, les différentes cytokines exercent leur effet via des processus différents, ce qui est probablement dû aux différentes chaînes composant les différents récepteurs. Il est donc attendu que chacune d'entre elles ait un effet différent.

#### 4.2.5. Synergie

La différence entre l'effet de l'IL-7 sur les cellules NK dans des PBMC et les cellules NK purifiées nous invite à considérer la possibilité de synergie avec d'autres cytokines. Comme mentionné précédemment, l'effet optimal de plusieurs cytokines survient lorsque celles-ci sont combinées à une autre cytokine. Sous l'influence de l'IL-7, il est fort probable que les autres cellules présentes dans les PBMC ont sécrété d'autres cytokines. De ce fait, nous pouvons penser que l'effet de l'IL-7 observé chez les PBMC est dû à d'autres cytokines que l'IL-7 et qu'ainsi, l'effet sur les cellules NK serait indirect. Toutefois, nos résultats ne concordent pas complètement avec cette hypothèse : l'IL-7 induit chez les NK dans les PBMC une prolifération spécifique des CD56<sup>bright</sup>, tout comme chez les cellules NK purifiées. Comme l'effet est toutefois plus important chez les cellules NK parmi les PBMC, nous croyons que l'IL-7 agit en synergie avec une ou plusieurs cytokines.

La première cytokine à considérer est l'IL-2 puisque tout comme l'IL-7, elle agit presque exclusivement sur les cellules NK CD56<sup>bright</sup> et que l'IL-7 induit l'expression de CD25. De plus, il est à exclure que l'effet observé de l'IL-7 sur les cellules NK parmi les PBMC soit entièrement dû à l'IL-2, puisque les deux profils de prolifération sont différents (figure 6). Aussi, une combinaison de l'IL-2 et l'IL-15 entraîne une forte production d'IFN- $\gamma$ . L'IL-12 et l'IL-18 sont également à considérer pour induire une bonne production d'IFN- $\gamma$  (Colucci *et al*, 2003; Cooper *et al*, 2001b; Lanier *et al*, 1986). L'IFN- $\alpha$  est également un agent stimulant important des cellules NK et le



gène de CD127 est sous la régulation du promoteur de l'IFN- $\alpha$ . L'IFN- $\alpha$  augmentera l'expression de CD127 et donc possiblement l'effet de l'IL-7.

#### 4.2.6. Rôle dans la maturation

Si nous considérons que l'IL-7 est connue comme étant une molécule de maturation, son rôle sur les cellules NK CD56<sup>bright</sup> pourrait relancer la théorie comme quoi les cellules NK CD56<sup>bright</sup> sont en fait immatures et que lorsqu'elles le deviendront, elles acquerront un phénotype CD56<sup>dim</sup>. D'ailleurs, une étude récente montre que, lorsque mise en contact avec des fibroblastes, la sous-population de cellules NK CD56<sup>bright</sup> se différencie en cellules NK CD56<sup>dim</sup> (Chan *et al*, 2007). En effet, après 7 jours, une nette diminution de la production d'IFN- $\gamma$  est observée, perte qu'ils estiment être due à celle des cellules NK CD56<sup>bright</sup>. Par cette démonstration, l'étude appuie la théorie voulant que les cellules NK CD56<sup>bright</sup> soient en fait simplement immatures comparativement aux cellules NK CD56<sup>dim</sup>. Ainsi, comme rapporté dans la littérature autant au niveau des cellules NK que des autres lymphocytes, l'IL-7 aurait un rôle à jouer au niveau de la maturation. Il serait donc normal que les cellules NK CD56<sup>bright</sup> expriment CD127 et soient plus sensibles à l'effet de l'IL-7 puisqu'elles seraient moins matures. D'un autre côté, l'étude démontrant l'immaturité des cellules NK CD56<sup>bright</sup> rapporte que les cellules NK CD56<sup>dim</sup> dérivées des cellules NK CD56<sup>bright</sup> ne produisent pas d'IFN- $\gamma$ , ce dernier jouant quand même un rôle important dans l'activité cytotoxique des NK CD56<sup>dim</sup>.

De plus, nous observons que sous IL-7, particulièrement les cellules NK CD56<sup>bright</sup> acquièrent un phénotype activé et leur nombre devient plus important sous IL-7 contrairement aux cellules NK CD56<sup>dim</sup>. D'ailleurs, une étude montre que les cellules NK CD56<sup>bright</sup> purifiées ne deviennent pas CD56<sup>dim</sup> sous stimulation (Dadmarz *et al*, 1994). Ainsi, la théorie de l'immaturation des cellules NK CD56<sup>bright</sup> perd de sa crédibilité puisqu'une cellule immature devrait premièrement acquérir sa maturation puis être activée. Nous proposons plutôt une théorie selon laquelle les deux sous-populations non activées sont matures et peuvent, sous différentes stimulations, acquérir des caractéristiques de l'autre sous-population. Par exemple, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> exercent un effet cytotoxique sous IL-7. On attribue normalement l'effet cytotoxique aux cellules NK CD56<sup>dim</sup> mais en réalité, on l'associe en fait souvent à l'expression de CD16. Or, nous savons maintenant que CD16 n'est pas la seule molécule pouvant induire la dégranulation des cellules NK puisqu'il y a ce phénomène lors des effets LAK et de la cytotoxicité naturelle (Moretta *et al*, 2001; Nagler *et al*, 1990). En effet, les récepteurs NCR peuvent engendrer la dégranulation des cellules NK activées (Moretta *et al*, 2000). Donc, des cellules NK pourraient être cytotoxiques sans nécessairement exprimer CD16 et donc être CD56<sup>dim</sup>. De ce fait, lorsqu'on stimule les NK avec de l'IL-15, on retrouve une seule population ayant grandement proliféré exprimant à la fois fortement CD56 et CD16, ayant une excellente activité cytotoxique et produisant une panoplie de cytokines activatrices (Carson *et al*, 1994).

## CONCLUSION

Le récepteur de l'IL-7 est présent chez les cellules NK matures humaines, et, contrairement ce qui observé chez la souris, n'est pas restreint aux seules cellules NK ayant mûri dans le thymus. L'expression de la chaîne alpha, CD127, est plus importante sur la population CD56<sup>bright</sup> que sur la population CD56<sup>dim</sup>. Sous IL-7, cette expression n'est diminuée que sur les CD56<sup>bright</sup>, ce qui suggère que seules les cellules NK CD56<sup>bright</sup> portent le récepteur complet. Un effet sur les fonctions des cellules NK (cytotoxicité, prolifération, expression de molécules d'activation) n'est observé que lorsque celles ci sont cultivées en présence des autres cellules sanguines mononuclées, suggérant donc un effet indirect via d'autres cellules immunitaires. Les seuls effets observés sur les cellules NK isolées sont une diminution de l'apoptose spontanée. Cette effet sur la survie s'accompagne s'une prédominance en culture des cellules CD56<sup>bright</sup>. Nos résultats suggèrent au total que l'IL-7 n'est pas une cytokine d'activation des cellules NK, mais plutôt une cytokine ayant une action sur la survie des seules cellules NK CD56<sup>bright</sup>.

## Références

- Abdul-Hai,A., Ben-Yehuda,A., Weiss,L., Friedman,G., Zakay-Romes,Z., Slavin,S., & Or,R. (1997) Interleukin-7-enhanced cytotoxic T lymphocyte activity after viral infection in marrow transplanted mice. *Bone marrow transplantation*, **19**, 539-543.
- Akashi,K., Traver,D., Miyamoto,T., & Weissman,I.L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, **404**, 193-197.
- Alderson,M.R., Sassenfeld,H.M., & Widmer,M.B. (1990) Interleukin 7 enhances cytolytic T lymphocyte generation and induces lymphokine-activated killer cells from human peripheral blood. *The journal of experimental medicine*, **172**, 577-587.
- Alpdogan,O., Schmaltz,C., Muriglian,S.J., Kappel,B.J., Perales,M.A., Rotolo,J.A., Halm,J.A., Plumb,D., & Van den Brink,M.R. (2001) Administration of interleukine-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood*, **98**, 2256-2265.
- Armant,M., Deplesse,G., & Sarfati,M. (1995) IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and up-regulate bcl-2 expression. *Immunology*, **85**, 331-337.
- Armitage,R.J., Namen,A.E., Sassenfeld,H.M., & Grabstein,K.H. (1990) Regulation of human T cell proliferation by IL-7. *Journal of Immunology*, **144**, 938-941.
- Baker,E., Sayers,T.J., Sutherland,G.R., & Smyth,M.J. (1994) The genes encoding NK cell granule serine proteases, human tryptase-2 (TRYP2) and human granzyme A (HFSP), both map to chromosome 5q11-q12 and define a new locus for cytotoxic lymphocyte granule tryptases. *Immunogenetics*, **40**, 235-237.
- Bauer,S., Groh,V., Wu,J., Steinle,A., Phillips,J.H., Lanier,L.L., & Spies,T. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for a stress-inducible MICA. *Science*, **285**, 645-647.
- Bennett,I.M., Zatzepina,O., Zamai,L., Azzoni,L., Mikheeva,T., & Perussia,B. (1996) Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. *The journal of experimental medicine*, **184**, 1845-1856.
- Biron,C.A. & Brossay,L. (2001) NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Current opinion in immunology*, **13**, 458-464.
- Boehm,U., Klamp,T., Groot,M., & Howard,J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology*, **15**, 749-795.

- Borrego,F., Kabat,J., Kim,D.K., Lieto,L., Maasho,K., Peña,J., Solana,R., & Coligan,J.E. (2002) Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Molecular immunology*, **38**, 637-660.
- Bossi,G. & Griffiths,G.M. (2005) CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Seminars in immunology*, **17**, 87-94.
- Bottino,C., Biassoni,R., Millo,R., Moretta,L., & Moretta,A. (2000) The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering. *Human Immunology*, **61**, 1-6.
- Bradley,M., Zeytun,A., Rafi-Janajreh,A., Nagarkatti,P.S., & Nagarkatti,M. (1998) Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas- tumor cells. *Blood*, **92**, 4248-4255.
- Brown,M.G., Dokun,A.O., Heusel,J.W., Smith,H.R., Beckman,D.L., Blattenberger,E.A., Dubbelde,C.E., Stone,L.R., Scalzo,A.A., & Yokoyama,W.M. (2001) Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science*, **292**, 934-937.
- Browne,K.A., Blink,E., Sutton,V.R., Froelich,C.J., Jans,D.A., & Trapani,J.A. (1999) Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Molecular and cellular biology*, **19**, 8604-8615.
- Bryceson,Y.T., March,M.E., Barber,D.F., Ljunggren,H.G., & Long,E.O. (2005) Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *The journal of experimental medicine*, **202**, 1001-1012.
- Carini,C., McLance,M.F., Mayer,K.H., & Essex,M. (1994) Dysregulation of interleukin-7 receptor may generate loss of cytotoxic T cell response in human immunodeficiency virus type 1 infection. *European journal of immunology*, **12**, 2927-2034.
- Carrega,P., Morandi,B., Frumento,G., Forte,G., Altavilla,G., Ratto,G.B., Mingari,M.C., Moretta,L., & Ferlazzo,G. (2008) Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56(bright)CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer*, **112**, 863-875.
- Carretero,M., Cantoni,C., Bellon,T., Bottino,C., Biassoni,R., Rodriguez,A., Perez-Villar,J.J., Moretta,L., Moretta,A., & Lopez-Botet,M. (1997) The CD94 NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer receptor for HLA class I molecules. *European Journal Immunology*, **27**, 563-567.
- Carson,W.E., Giri,J.G., Lindemann,M.J., Linett,M.L., Ahdieh,M., Paxton,R., Anderson,D., Eisenmann,J., Grabstein,K., & Caligiuri,M.A. (1994) Interleukine (IL) 15 is a novel

cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *Journal experimental medicine*, **180**, 1395-1403.

- Chan,A., Hong,D., Atzberger,A., Kollnberger,S., Filer,D.A., Buckley,D.C., McMichael,A., Enver,T., & Bowness,P. (2007) CD56<sup>bright</sup> human NK cells differentiate into CD56<sup>dim</sup> cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *The journal of immunology*, **179**, 89-94.
- Chirifu,M., Hayashi,C., Nakamura,T., Toma,S., Shuto,T., Kai,H., Yamagata,Y., Davis,S.J., & Ikemizu,S. (2007) Crystal structure of the IL-15–IL-15R complex, a cytokine-receptor unit presented *in trans*. *Nature immunology*, **8**, 1001-1007.
- Colle,J.H., Moreau,J.L., Fontanet,A., Lambotte,O., Delfraissy,J.F., & Thèse,J. (2007) The correlation between levels of IL-7R $\alpha$  expression and responsiveness to IL-7 is lost in CD4 lymphocytes from HIV-infected patients. *AIDS*, **21**, 101-103.
- Colucci,F., Caligiuri,M.A., & Di Santo,J.P. (2003) What does it take to make a natural killer. *Nature review immunology*, **3**, 413-425.
- Cooper,M.A., Fehniger,T.A., & Caligiuri,M.A. (2001a) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology*, **22**, 633-640.
- Cooper,M.A., Fehniger,T.A., Turner,S.C., Chen,K.S., Ghaheri,B.A., Ghayur,T., Carson,W.E., & Caligiuri,M.A. (2001b) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset. *Blood*, **97**, 3146-3151.
- Croy,B.A., Chantakru,S., Esadeg,S., Ashkar,A.A., & Wei,Q. (2002) Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). *Journal of reproductive immunology*, **57**, 151-168.
- Dadmarz,R., Bockstoce,D.C., & Golub,S.H. (1994) Interleukin-7 selectively enhances natural kill cytotoxicity mediated by the CD56<sup>bright</sup> natural killer subpopulation. *Lymphokine and cytokine research*, **13**, 349-357.
- Dalle,J.H., Menezes,J., Wagner,E., Blagdon,M., Champagne,J., Champagne,M.A., & Duval,M. (2005) Characterization of cord blood natural killer cells:implication for transplantation and neonatal infections. *Pediatric research*, **57**, 1-7.
- Deans,J.P., Boyd,A.W., & Pilarski,L.M. (1989) Transitions from high to low molecular weight isoforms of CD45 (T200) involve rapid activation of alternate mRNA splicing and slow turnover of surface CD45R. *Journal of Immunology*, **143**, 1233-1238.
- Fan,Q.R. & Wiley,D.C. (1999) Structure of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4, a ligand for the KIR2D natural killer cell inhibitory receptor. *Journal experimental medicine*, **190**, 113-123.

- Farag,S.S., Fehniger,T.A., Ruggeri,L., Velardi,A., & Caligiuri,M.A. (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*, **100**, 1935-1947.
- Fehniger,T.A., Cooper,M.A., Nuovo,G.J., Cella,M., Facchetti,F., Colonna,M., & Caligiuri,M.A. (2003) CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*, **101**, 3052-3057.
- Fehniger,T.A., Shah,M.H., Turner,M.J., VanDeusen,J.B., Whitman,S.P., Cooper,M.A., Suzuki,K., Wechser,M., Goodsaid,F., & Caligiuri,M.A. (1999) Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *Journal of immunology*, **162**, 4511-4520.
- Frohn,C., Schlenke,P., & Kirchner,H. (1997) The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes. *Immunology*, **92**, 567-570.
- Gilmour,K.C., Fujii,H., Cranston,T., Davies,E.G., Kinnon,C., & Gaspar,H.B. (2001) Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. *Blood*, **98**, 877-879.
- Goodwin,R.G., Friend,D., Ziegler,S.F., Jerzy,R., Falk,B.A., Gimpel,S., Coman,D., Dower,S.K., March,C.J., & Namen,A.E. (1990) Cloning of the human and murine interleukine -7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell*, **60**, 941-951.
- Gumperz,J.E., Litwin,V., Phillips,J.H., Lanier,L.L., & Parham,P. (1995) The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *Journal experimental medecine*, **181**, 1133-1144.
- Haller,O. & Wigzell,H. (1977) Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent. *Journal of Immunology*, **118**, 1503-1506.
- He,Y.W. & Malek,T.R. (1996) Interleukine-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + cells, but not natural killer cells. *Journal experimental medecine*, **184**, 289-293.
- Henney,C.S., Kuribayashi,K., Kern,D.E., & Gillis,S. (1981) Interleukine-2 augments natural killer cell activity. *Nature*, **291**, 335-338.
- Hermiston,M.L., Xu,Z., & Weiss,A. (2003) CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual Reviews Immunology*, **21**, 107-137.

- Hoshino,T., Wiltrout,R.H., & Young,H.A. (1999) IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *Journal of immunology*, **162**, 5070-5077.
- Houchins,J.P., Yabe,T., McSherry,C., & Bach,F.H. (1991) DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *Journal experimental medecine*, **173**, 1017-1020.
- Hulett,M.D. & Hogarth,P.M. (1994) Molecular basis of Fc receptor function. *Advances in immunology*, **57**, 127.
- Huntington,D.N., Puthalakath,H., Gunn,P., Naik,E., Michalak,E.M., Smyth,M.J., Tabarias,H., Degli-Esposti,M.A., Dewson,G., Willis,S.N., Motoyama,N., Huang,D.C.S., Nutt,S.L., Tarlinton,D.M., & Strasser,A. (2007) Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nature immunology*, **8**, 856-863.
- Igarashi,H., Gregory,S.C., Yokota,T., Sakaguchi,N., & Kincade,P.W. (2002) Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity*, **17**, 117-130.
- Irie-Sasaki,J., Sasaki,T., Matsumoto,W., Opavsky,A., Cheng,M., Welstead,G., Griffiths,E., Krawczyk,C., Richardson,C.D., Aitken,K., Iscove,N., Koretzky,G., Johnson,P., Liu,P., Rothstein,D.M., & Penninger,J.M. (2001) CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, **409**, 349-354.
- Jacobs,R., Hintzen,G., Kemper,A., Beul,K., Kempf,S., Behrens,G., Sykora,K.W., & Schmidt,R.E. (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European Journal Immunology*, **31**, 3121-3127.
- Jiang,Q., Li,W.Q., Aiello,F.B., Klarmann,K.D., Keller,J.R., & Durum,S.K. (2005) Retroviral transduction of IL-7Ralpha into IL-7Ralpha-/- bone marrow progenitors: correction of lymphoid deficiency and induction of neutrophilia. *Gene therapy*, **12**, 1761-1768.
- Kelly,J.M., O'Connor,M.D., Hulett,M.D., Thia,K.Y., & Smyth,M.J. (1996) Cloning and expression of the recombinant mouse natural killer cell granzyme Met-ase-1. *Immunogenetics*, **44**, 340-350.
- Kiessling,R., Haller,O., Fenyo,E.M., Steinitz,M., & Klein,E. (1978) Mouse natural killer (NK) cell activity against human cell lines is not influenced by sperinfection of the target cell with xenotropic murine C-type virus. *International journal of cancer*, **21**, 460-465.
- Kiessling,R., Klein,E., & Wigzell,H. (1975) Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European Journal Immunology*, **5**, 112-117.



- Kim,H.P., Imbert,J., & Leonard,W.J. (2006) Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokines growth factor reviews*, **17**, 349-366.
- Kondo,M., Weissman,I.L., & Akashi,K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, **91**, 661-672.
- Konjevic,G., Schlesinger,B., Cheng,L., Olsen,K.J., Podack,E.R., & Spuzic,I. (1995) Analysis of perforin expression in human peripheral blood lymphocytes, CD56+ natural killer cell subsets and its induction by interleukin-2. *Immunological investigations*, **24**, 499-507.
- Lai,S.Y., Moden,J., & Goldsmith,M.A. (1997) Shared gamma(c) subunit within the human interleukin-7 receptor complex. A molecular basis for the pathogenesis of X-linked severe combined immunodeficiency. *The journal of clinical investigation*, **99**, 169-177.
- Lanier,L.L. (2005) NK cell recognition. *Annual review of immunology*, **23**, 225-274.
- Lanier,L.L., Chang,C., Azuma,M., Ruitenberg,J.J., Hemperly,J.J., & Phillips,J.H. (1991) Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *Journal of immunology*, **146**, 4421-4426.
- Lanier,L.L., Le,A.M., Civin,C.I., Loken,M.R., & Phillips,J.H. (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Journal of immunology*, **136**, 4480-4486.
- Lanier,L.L., Rhodes,L., Ding,A., Evans,E., Barney,C., & Phillips,J.H. (1988) Interleukine 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23Buck DW activation antigen. *Journal experimental medecine*, **167**, 1572-1585.
- Lanier,L.L., Testi,R., Bindl,J., & Phillips,J.H. (1989) Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *The journal of experimental medecine*, **169**, 2233-2238.
- Lee,S.H., Girard,S., Macina,D., Busà,M., Zafer,A., Belouchi,A., Gros,P., & Vidal,S.M. (2001) Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nature genetics*, **28**, 7-9.
- Leonard,W.J. (1996) The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling. *Annual review in medecine*, **47**, 229-239.
- Leonard,W.J. (2002) TSLP: finally in the limelight. *Nature Immunology*, **3**, 673-680.
- Leonard,W.J., Noguchi,M., & Russel,S.M. (1994) Sharing of a common gamma chain, gamma c, by the IL-2, IL-4, and IL-7 receptors: implications for X-linked severe

combined immunodeficiency (XSCID). *Adeavance in experimental medecine and biology*, **365**, 225-232.

- Lin,H., Nieda,M., & Nicol,A.J. (2004) Differential proliferative response of NKT cell subpopulations to *in vitro* stimulation in presence of different cytokines. *European journal of immunology*, **34**, 2664-2671.
- Litwin,V., Gumperz,J.E., Parham,P., Phillips,J.H., & Lanier,L.L. (1994) NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *Journal experimental medecine*, **180**, 537-543.
- Liu,W., Putnam,A.L., Xu-Yu,Z., Szot,G.L., Lee,M.R., Zhu,S., Gottlieb,P.A., Kapranov,P., Gingeras,T.R., Fazekas de St Groth,B., Clayberger,C., Soper,D.M., Ziegler,S.F., & Bluestone,J.A. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *Journal experimental medecine*, **203**, 1701-1711.
- Loza,M.J. & Perussia,B. (2001) Final steps of natural killer cell maturation: a model for type 1-type 2 differentiation? *Nature immunology*, **2**, 917-924.
- Loza,M.J., Peters,S.P., Zangrilli,J.G., & Perussia,B. (2002) Distinction between IL-13+ and IFN-gamma+ natural killer cells and regulation of their pool size by IL-4. *European journal of immunology*, **32**, 413-423.
- Lum,J.J., Schnepple,D.J., Nie,Z., Sanchez-Dardon,J., Mbisa,G.L., Mihowich,J., Hawley,N., Narayan,S., Kim,J.E., Lynch,D.H., & Badley,A.D. (2004) Differential effects of interleukin-7 and interleukin-15 on NK cell anti-human immunodeficiency virus activity. *Journal of virology*, **78**, 6033-6042.
- Ma,A., Koka,R., & Burkett,P. (2006) Diverse fonction of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annual review of immunology*, **24**, 657-679.
- Maraskovsky,E., O'Reilly,L.A., Teepe,M., Corcoran,L.M., Peschon,J.J., & Strasser,A. (1997) Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1/- mice. *Cell*, **89**, 1011-1019.
- Mazzucchelli,R. & Durum,S.K. (2007) Interleukine-7 recptor expression: intelligent design. *Nature reviews immunology*, **7**, 144-154.
- Miller,J.P., Izon,D., DeMuth,W., Gerstein,R., Bhandoola,A., & Allman,D. (2002) The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. *The journal of experimental medecine*, **196**, 705-711.
- Miller,J.S. & McCullar,V. (2001) Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood*, **98**, 705-713.

- Montel,A.H., Bochan,M.R., Hobbs,J.A., Lynch,D.H., & Brahmi,Z. (1995) Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cellular immunology*, **166**, 236-246.
- Moretta,A., Biassoni,R., Bottino,C., Mingari,M.C., & Moretta,L. (2000) Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunology today*, **21**, 228-234.
- Moretta,A., Bottino,C., Vitale,M., Pende,D., Cantoni,C., Mingari,M.C., Biassoni,R., & Moretta,L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*, **19**, 197-223.
- Morris,A. (1990) Modification of histocompatibility antigen expression in cells expressing activated oncogenes: implications for tumour development. *Anticancer research*, **10**, 1161-1167.
- Mrózek,E., Anderson,P., & Caligiuri,M.A. (1996) Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **87**, 2632-2640.
- Murray,R., Suda,T., Wrighton,N., Lee,F., & Zlotnik,A. (1989) IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocytes subsets. *International Immunology*, **1**, 526-531.
- Muta,T., Kurosaki,T., Misulovin,Z., Sanchez,M., Nussenzweig,M.C., & Ravetch,J.V. (1994) A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature*, **368**, 70-73.
- Nagler,A., Lanier,L.L., & Phillips,J.H. (1990) Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *The journal of experimental medicine*, **171**, 1527-1533.
- Nakajima,H., Cella,M., Bouchon,A., Grierson,H.L., Lewis,J., Duckett,C.S., Cohen,J.I., & Colonna,M. (2000) Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity. *European journal of immunology*, **30**, 3309-3318.
- Namen,A.E., Lupton,S., Hjerrild,K., Wignall,J., Mochizuki,D.Y., Schmierer,A., Mosley,B., March,C.J., Urdal,D., & Gillis,S. (1988) Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukine-7. *Nature*, **1**, 526-531.
- Naume,B. & Espevik,T. (1991) Effects of IL-7 and IL-2 on highly enriched CD56+ natural killer cells. *Journal of immunology*, **147**, 2208-2214.
- Naume,B., Gately,M., & Espevik,T. (1992) A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-2-, and IL-7-induced effects on immunomagnetically purified CD56+ NK cells. *Journal of immunology*, **149**, 2429-2436.

- Nguyen,S., Dhedin,N., Vernant,J.P., Kuentz,M., Jijakli,A.A., Rouas-Freiss,N., Carosella,E.D., Boudifa,A., & Vieillard,V. (2005) NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2Aoverride GvL effect. *Blood*, **105**, 4135-4142.
- Orange,J.S., Wang,B., Terhorst,C., & Biron,C.A. (1995) Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *The journal of experimental medicine*, **182**, 1045-1056.
- Page,T.H., Willcolcks,J.L., Taylor-Fishwick,D.A., & Foxwell,B.M. (1993) Characterization of a novel high affinity human IL-7 receptor. Expression on T cells and association with IL-7 driven proliferation. *Journal of immunology*, **151**, 4753-4763.
- Parrish-Novak,J., Dillon,S.R., Nelson,A., Hammind,A., Sprecher,C., Gross,J.A., Johnston,J., Madden,K., Xu,W., West,J., Schrader,S., Burkhead,S., Heipel,M., Brandt,C., Kuijper,J.L., Kramer,J., Conklin,D., Presnell,S.R., Berry,J., Shiota,F., Bort,S., Hambly,K., Mudri,S., Clegg,C., Moore,T.A., Grant,F.J., Lofton-Day,C., Gilbert,T., Rayond,F., Ching,A., Yao,L., Smith,D., Webster,P., Whitmore,T., Maurer,M., Kaushansky,K., Holly,R.D., & Foster,D. (2000) Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*, **408**, 57-63.
- Passlick,B., Izbicki,J.R., Waydhas,C., Nast-Kolb,D., Schweiberer,L., & Ziegler-Heitbrock,H.W. (1991) Posttraumatic splenectomy does not influence human peripheral blood mononuclear cell subsets. *Journal of clinical & laboratory immunology*, **34**, 157-161.
- Pende,D., Cantoni,C., Rivera,P., Vitale,M., Castriconi,R., Marcenaro,S., Nanni,M., Biassoni,R., Bottino,C., Moretta,A., & Moretta,L. (2001) Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *European Journal Immunology*, **31**, 1076-1086.
- Peritt,D., Robertson,S., Gri,G., Showe,L., Aste-Amezaga,M., & Trinchieri,G. (1998) Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *Journal of immunology*, **161**, 5821-5824.
- Pleiman,C.M., Gimpel,S.D., Taniguchi,T., & Ziegler,S.F. (1991) Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type-I-interferon-inducible promoter. *Molecular and cellular biology*, **11**, 3052-3059.
- Pollard,K.M., Hultman,P., & Kono,D.H. (2003) Using single-gene deletions to identify checkpoints in the progression of systemic autoimmunity. *Annals of New York academy of science*, **987**, 236-239.
- Puel,A., Buckley,R.H., & Leonard,W.J. (1998) Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nature Genetic*, **20**, 394-397.

- Ramos,S.B., Garcia,A.B., Viana,S.R., Voltarelli,J.C., & Falcão,R.P. (1996) Phenotypic and functional evaluation of natural killer cells in thymectomized children. *Clinical immunology and immunopathology*, **81**, 277-281.
- Ramsdell,F.J., Shau,H., & Golub,S.H. (1988) Role of proliferation in LAK celle development. *Cancer immunology immunotherapy*, **26**, 139-144.
- Rosmaraki,E.E., Douagi,I., Roth,C., Colucci,F., Cumano,A., & Di Santo,J.P. (2001) Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *European journal of immunology*, **31**, 1900-1909.
- Ruggeri,L., Capanni,M., Urbani,E., Perruccio,K., Shlomchik,W.D., Tosti,A., Posati,S., Rogaia,D., Frassoni,F., Aversa,F., Martelli,M.F., & Velardi,A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, **295**, 2029-2031.
- Salazar-Mather,T.P., Hamilton,T.A., & Biron,C.A. (2000) A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *The journal of clinical investigation*, **105**, 985-993.
- Santoli,D., Trinchieri,G., & Koprowski,H. (1978) Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. II. Interferon induction and activation of natural killer cells. *Journal of Immunology*, **121**, 532-538.
- Seddon,B., Tomlinson,P., & Zamoyska,R. (2003) Interleukine 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nature Immunology*, **4**, 680-686.
- Shamin,Z., Ryder,L.P., Heilmann,C., Madsen,H., Lauersen,H., Andersen,P.K., Svejgaard,A., Jacobsen,N., & Müller,K. (2006) Genetic polymorphisms in the genes encoding human interleukine-7 recptor- $\alpha$  :prognostic significance in allogeneic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, **37**, 485-491.
- Sharfe,N., Dadi,H.K., Shahar,M., & Roifman,C.M. (1997) Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 3168-3171.
- Shlomchik,W.D., Couzens,M.S., Tang,C.B., McNiff,J., Robert,M.E., Liu,J., Shlomchik,M.J., & Emerson,S.G. (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*, **285**, 412-415.
- Sirianni,M.C., Businco,L., Seminara,R., & Aiuti,F. (1983) Severe combined immunodeficiencies, primary T-cell defects and DiGeorge syndrome in humans: characterization by monoclonal antibodies and natural killer cell activity. *Clinical immunology and immunopathology*, **28**, 361-370.
- Sivori,S., Falco,M., Marcenaro,E., Parolini,S., Biassoni,R., Bottino,C., Moretta,L., & Moretta,A. (2002) Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 4526-4531.

Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E.A., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L.H., Degli-Esposti, M.A., & Hayakawa, Y. (2005) Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology*, **42**, 501-510.

Snyder, K.M., Mackall, C.L., & Fry, T.J. (2006) IL-7 in allogeneic transplant: clinical promise and potential. *Leukemia and lymphoma*, **47**, 1222-1228.

Stauber, D.J., Debler, E.W., Horton, P.A., Smith, K.A., & Wilson, I.A. (2006) Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 2788-2793.

Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamkoshi, M., Yoshida, H., & Nishikawa, S. (1993) Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 9125-9129.

Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., & Okumura, K. (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature medicine*, **7**, 94-100.

Taniguchi, T. (1995) Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*, **268**, 251-255.

Testi, R., Phillips, J.H., & Lanier, L.L. (1989) T cell activation via Leu-23 (CD69). *Journal of immunology*, **143**, 1123-1128.

Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., & Wilkinson, G.W. (2000) Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*, **287**, 1031-1033.

Trinchieri, G. & Santoli, D. (1978) Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells lysis. *Journal experimental medicine*, **147**, 1314-1333.

Van der Vliet, H.J., Nishi, N., Kozuka, Y., Peyrat, M.A., Von Blomberg, B.M., Van den Eertwegh, A.J., Pinedo, H.M., Giaccone, G., & Scheper, R.J. (1999) Effects of alpha-galactosyl-ceramide (KRN7000), interleukine-12 and interleukine-7 on phenotype and cytokine profile of human Valpha24+ Vbeta11+ T cells. *Immunology*, **98**, 557-563.

- Vosshenrich,C.A.J., Garcia-Ojeda,M.E., Samson-Villéger,S.I., Pasqualetto,V., Enault,L., Richard-Le Goff,O., Corcuff,E., Guy-grand,D., Rocha,B., Cumano,A., Rogge,L., Ezine,S., & Di Santo,J.P. (2006) A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nature Immunology*, **7**, 1217-1224.
- Williams,N.S., Moore,T.A., Schatzel,J.D., Puzanov,I.J., Sivakumar,P.V., Zlotnik,A., Bennett,M., & Kumar,V. (1997) Generation of lytic natural killer 1.1+, Ly-49- cells from multipotential murine bone marrow progenitors in a stroma-free culture: definition of cytokine requirements and developmental intermediates. *The journal of experimental medicine*, **186**, 1609-1614.
- Wolfe,S.A., Tracey,D.E., & Henney,C.S. (1976) Introduction of Natural killer cells by BCG. *Nature*, **262**, 584-586.
- Wu,J., Song,Y., Bakker,A.B., Bauer,S., Spies,T., Lanier,L.L., & Phillips,J.H. (1999) An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, **285**, 730-732.
- Yewdell,J.W. & Del Val,M. (2004) Immunodominance in TCD8+ responses to viruses: cell biology, cellular immunology, and mathematical models. *Immunity*, **21**, 149-153.
- Yoshida,A., Koide,Y., Uchijima,M., & Yoshida,T.O. (1994) IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochemical and biophysical research communications*, **198**, 857-861.
- Yu,H., Fehniger,T.A., Fuchshuber,P., Thiel,K.S., Vivier,E., Carson,W.E., & Caligiuri,M.A. (1998) Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood*, **92**, 3647-3657.