

Les Cellules Tueuses Naturelles (Natural Killer Cells) sur le devant de la scène immunologique

Jacques ZIMMER
Laboratoire d'Immunogénétique-Allergologie
Centre de Recherche Public (CRP) de la Santé
L-1526 Luxembourg
jacques.zimmer@crp-sante.lu

Nancy, 10.4.2014

DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES SANGUINES

globules rouges ou érythrocytes:

transport de l'oxygène des poumons à tous les tissus de l'organisme

globules blancs ou leucocytes:

différents types cellulaires, faisant partie du système immunitaire

plaquettes ou thrombocytes:

fragments cellulaires nécessaires pour la coagulation sanguine

- **Immunologie:**
 - étude des défenses de l'organisme contre les infections, du point de vue cellulaire et moléculaire
- **Immunité:**
 - protection contre les maladies infectieuses
- **Système immunitaire:**
 - cellules, tissus, organes et molécules responsables de l'immunité
- **Fonction physiologique du système immunitaire:**
 - défense contre les microbes infectieux (bactéries, virus, parasites)

COMPOSANTES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

- **cellules (globules blancs)**
- **tissus (moelle osseuse, tissus lymphoïdes périphériques)**
- **organes (thymus, rate, ganglions lymphatiques)**
- **médiateurs solubles (cytokines, chimiokines)**

ORIGINE DES CELLULES IMMUNITAIRES

- toutes les cellules du système immunitaire se développent dans la moelle osseuse

- de même, les précurseurs des globules rouges et des plaquettes sont originaires de la moelle osseuse

Immunité Innée:

- première ligne de défense contre les microbes
- en place avant l'infection
- réponse rapide mais toujours de la même façon
(pas de spécificité pour un pathogène donné)
- composantes:
 - ° surfaces épithéliales (barrières physiques comme la peau)
 - ° molécules antimicrobiennes présentes à ces surfaces
 - ° cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles)
 - ° cellules tueuses naturelles (natural killer cells ou NK cells)
 - ° (cellules dendritiques)
 - ° plaquettes
 - ° cytokines (régulation et coordination de la réponse immunitaire)

cellules myéloïdes :

granulocytes polynucléaires (circulation sanguine)

- neutrophiles
- éosinophiles
- basophiles

monocytes (circulation sanguine)

macrophages:

différenciés des monocytes et présents dans les tissus

mastocytes (dans les tissus mais pas dans la circulation)

cellules lymphoïdes:

cellules NK (circulation et tissus)

cellules lymphoïdes innées (innate lymphoid cells), plutôt dans les tissus

fragments cellulaires:

plaquettes

Immunité Adaptative:

- commence plus tard, est effectuée par des lymphocytes
- est adaptée au type de l'infection
- **spécificité:** est spécifique d'un microbe donné
- **mémoire:**
réponse plus rapide et plus vigoureuse en cas de réinfection par le même microbe
- **immunité humorale:**
anticorps produits et sécrétés par les lymphocytes B
- **immunité cellulaire:**
destruction des cellules infectées par les lymphocytes T
- **cytokines:** régulation and coordination de la réponse immunitaire

LYMPHOCYTES (1)

- nombre total chez un adulte sain: 5×10^{11} – 2×10^{12}
- l'ensemble des lymphocytes représente environ 2 % du poids corporel
- 20 % des globules blancs périphériques
- distribution de la population lymphocytaire totale:
 - ° sang: 2 %
 - ° moelle osseuse: 10 %
 - ° muqueuses digestives et respiratoires: 15 %
 - ° rate et ganglions lymphatiques: 65 %
 - ° le reste dans d'autres organes
- beaucoup de lymphocytes persistent dans le corps en tant que cellules mémoire et peuvent vivre pendant plusieurs années

LYMPHOCYTES (2)

1) lymphocytes B :

production d'anticorps

2) lymphocytes T:

lymphocytes T auxiliaires, CD4+ (helper T cells)
production de cytokines

lymphocytes T cytotoxiques, CD8+ (cytotoxic T cells)
destruction de cellules infectées et de cellules tumorales

lymphocytes T régulateurs, CD4+ ou CD8+ (regulatory T cells)
contrôle de l'intensité de la réponse immunitaire

3) cellules lymphoïdes innées:

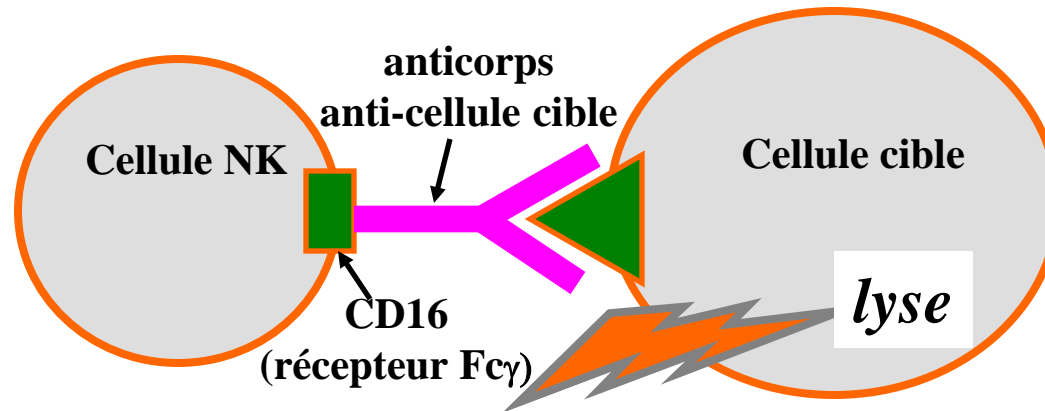
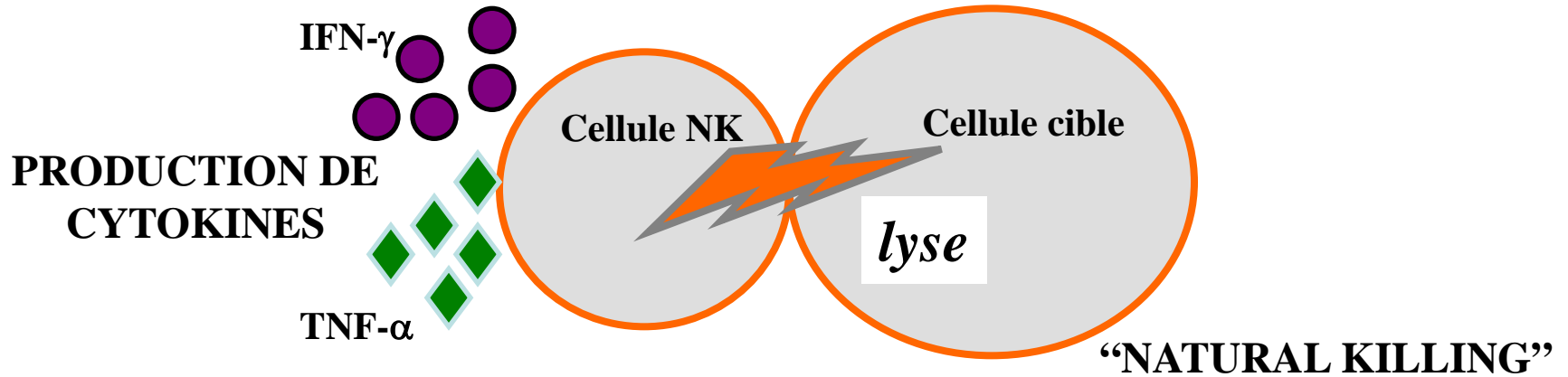
cellules tueuses naturelles (NK cells)

cellules lymphoïdes innées de type 1, 2 ou 3 (découverte récente)

CELLULES TUEUSES NATURELLES (NK CELLS)

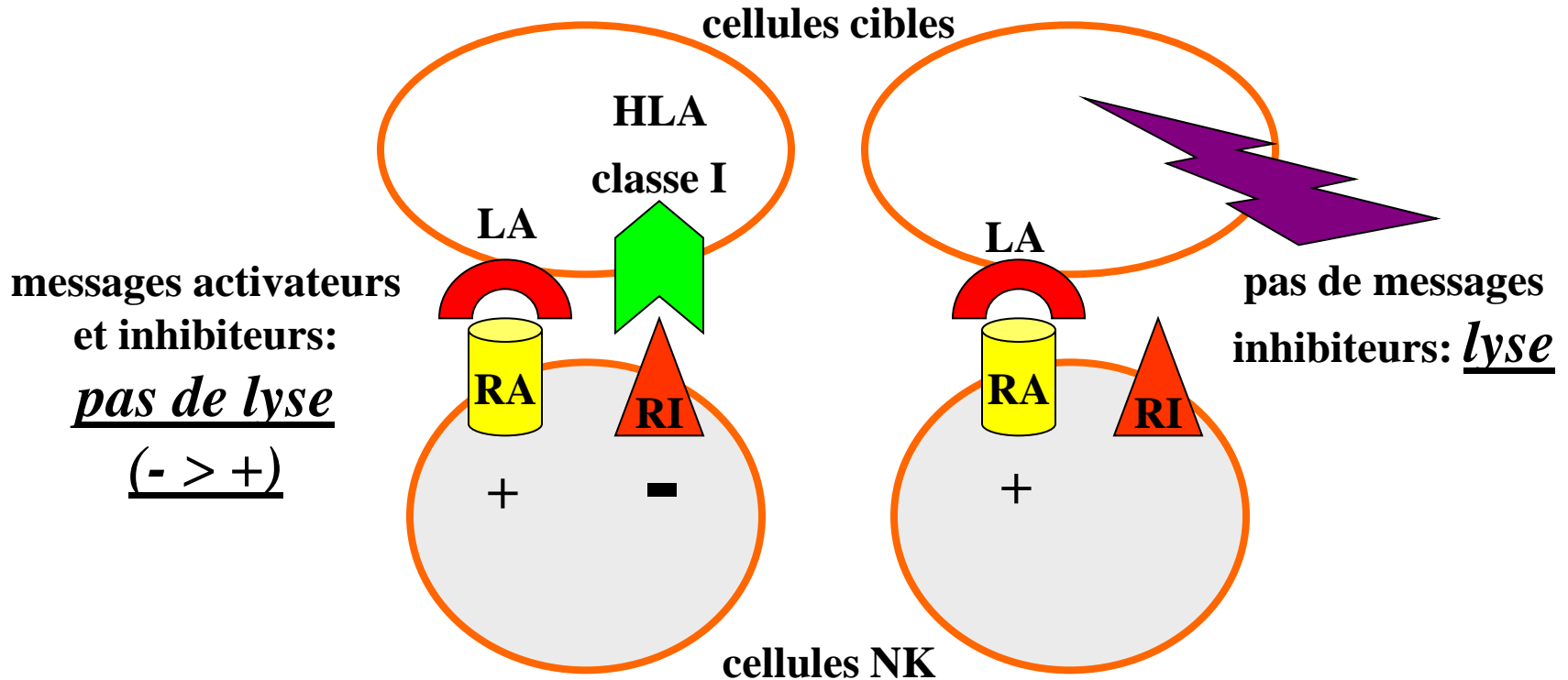
- lymphocytes de taille supérieure aux lymphocytes B et T
- représentent 10 – 20 % des lymphocytes du sang circulant
- aussi présentes dans les tissus (rate, poumon, utérus,.....)
- contiennent des granules chargés de molécules cytotoxiques
- fonctions les plus importantes:
 - ° destruction de cellules infectées par des virus
 - ° production de cytokines pour stimuler la réponse immunitaire
 - ° sont aussi capables de détruire des cellules tumorales
- peuvent devenir des cellules mémoire (rôle dans l'immunité adaptative)

PROPRIÉTÉS DES CELLULES NK

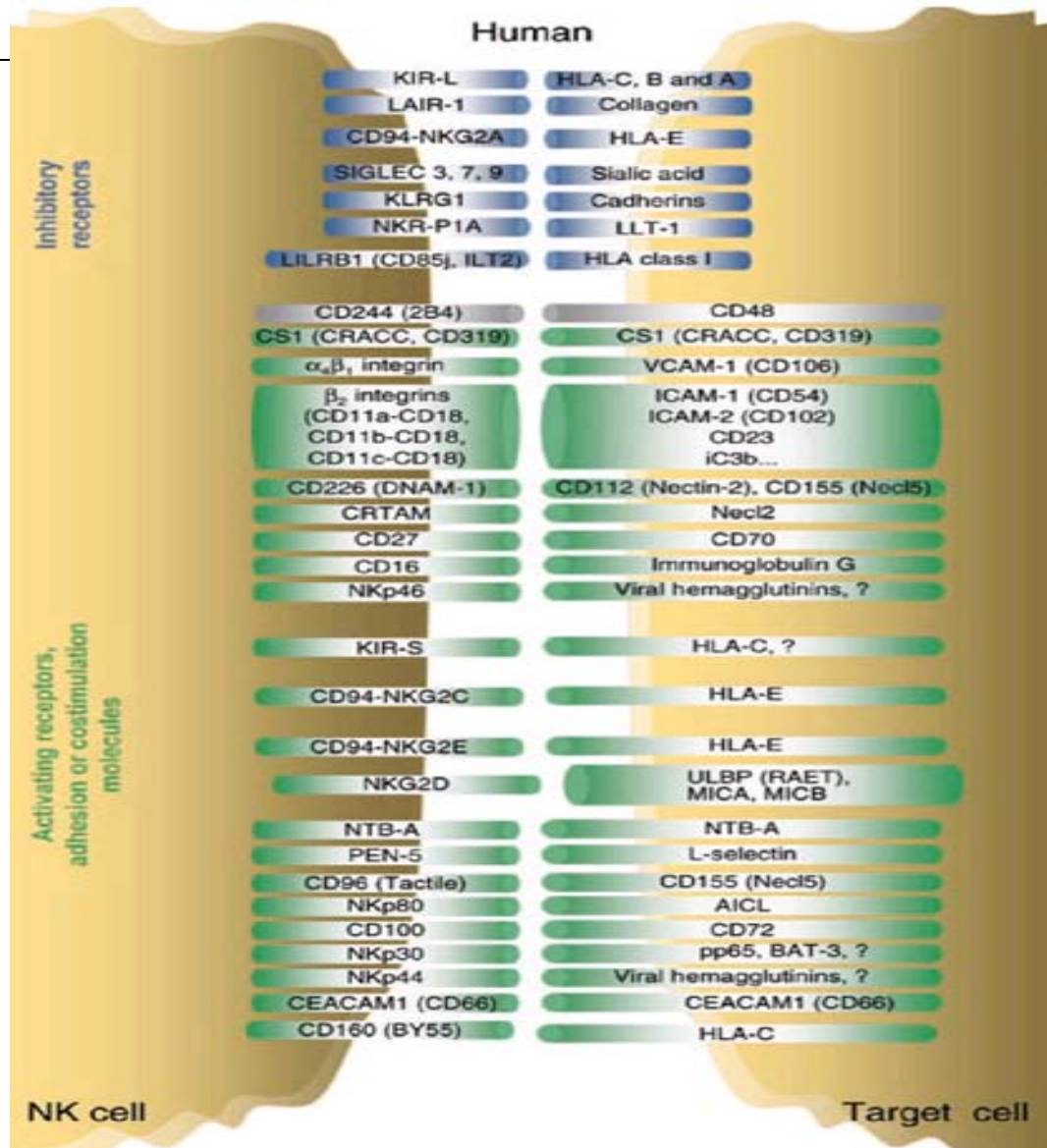


**CYTOTOXICITÉ DÉPENDANTE D'ANTICORPS (ANTIBODY-DEPENDENT
CELLULAR CYTOTOXICITY, ADCC)**

BALANCE ENTRE MESSAGES ACTIVATEURS ET INHIBITEURS



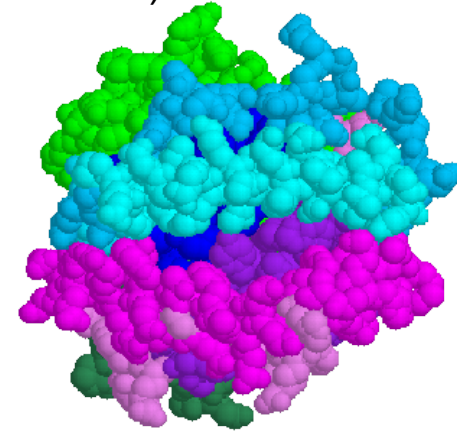
RÉCEPTEURS DES CELLULES NK ET LEURS LIGANDS



Vivier et al.,
Nat Immunol 2008

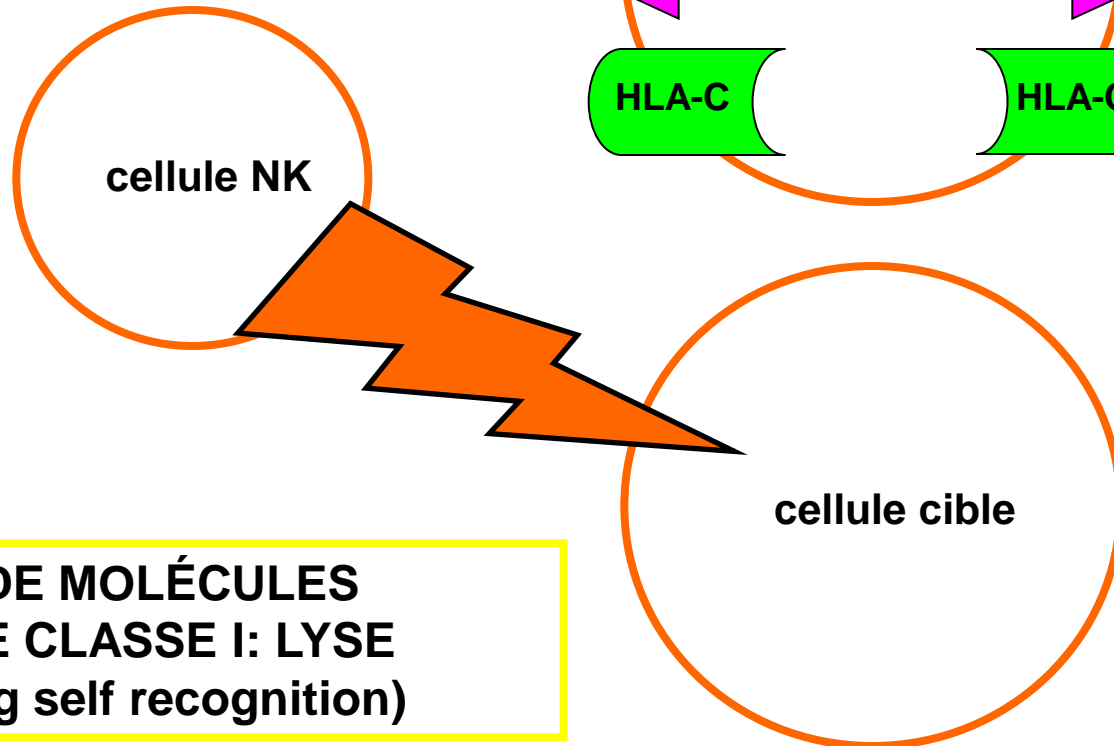
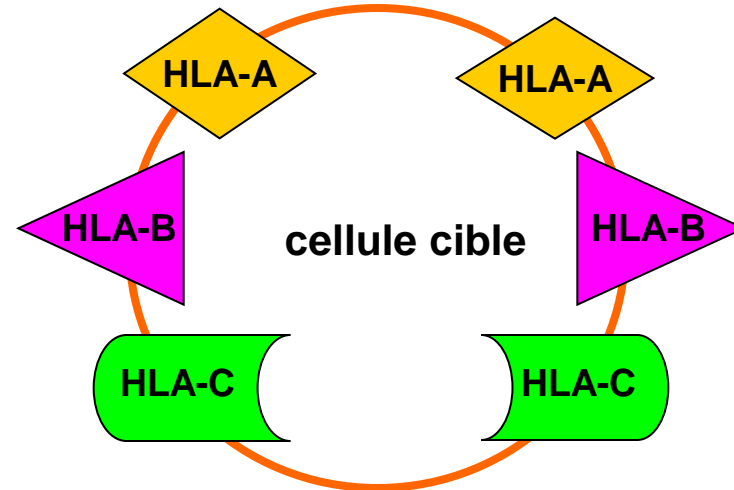
MOLÉCULES HLA DE CLASSE I

- **HLA = Human Leukocyte Antigen** (major histocompatibility complex – MHC)
HLA classe I exprimée à la surface de la plupart des cellules nucléées
- **structure:**
chaîne lourde (molécule HLA) et chaîne légère (β 2-microglobuline)
- gènes sur le chromosome 6: HLA-A, HLA-B, HLA-C
- **caractéristiques:**
transmis comme haplotype
un haplotype paternel, un haplotype maternel
polymorphisme extrême
nombre très élevé de variants alléliques
expression co-dominante
jusqu'à six molécules HLA de classe I différentes par individu
- **rôles:**
stimulation des lymphocytes T cytotoxiques CD8+
inhibition des cellules NK



LYSE DE CELLULES SANS MOLÉCULES HLA DE CLASSE I PAR LES CELLULES NK

**EXPRESSION DE MOLÉCULES
HLA DE CLASSE I:
PAS DE LYSE**



**PAS DE MOLÉCULES
HLA DE CLASSE I: LYSE
(missing self recognition)**

cellule cible potentielle:

corrélation inverse entre le niveau d'expression des molécules HLA de classe I et la sensibilité à la lyse par les cellules NK

donc pas de lyse des cellules autologues normales

car expression normale des molécules HLA de classe I

lyse si absence ou expression réduite de ces molécules

fréquemment retrouvé au niveau des cellules tumorales et des cellules infectées par des virus

lyse si: absence du “soi (self)”, missing self

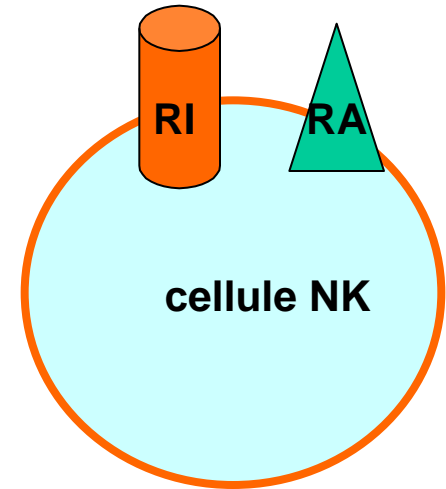
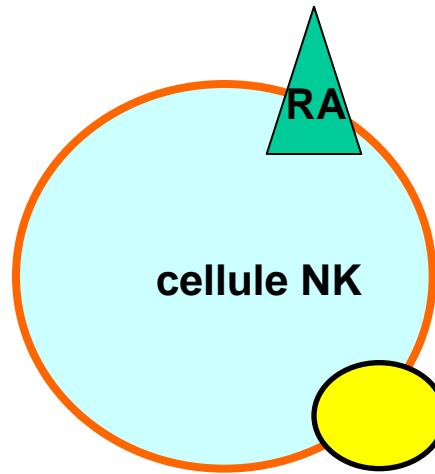
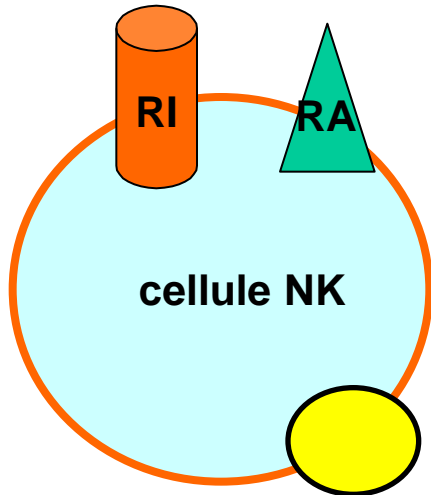
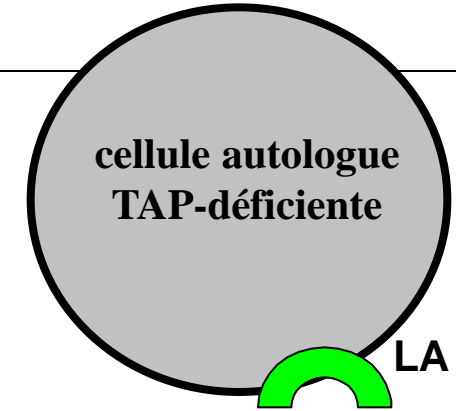
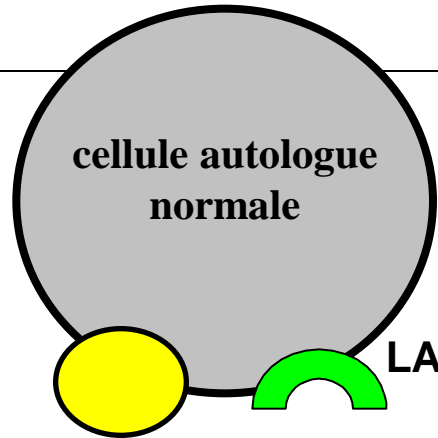
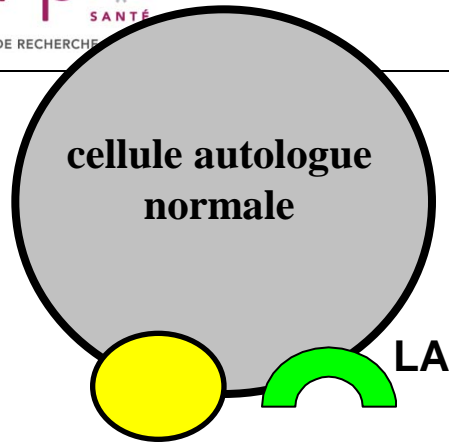
LES PRINCIPAUX RÉCEPTEURS INHIBITEURS DES CELLULES NK HUMAINES

- 1) KIR (CD158): spécifiques pour des groupes restreints de molécules HLA de classe I
- 2) ILT2 (CD85j): reconnaît HLA-A, -B, -C
- 3) NKG2A (CD159a): reconnaît HLA-E (molécule de classe I non polymorphe)

avec le typage HLA d'un individu donné, il est possible de déterminer:

- ses cellules NK exprimant un ou plusieurs RI spécifiques des molécules HLA de classe I autologues
(self recognition – cellules NK éduquées)
- ses cellules NK sans RI autologue
(pas de self recognition – cellules NK non éduquées et hyporéactives)

ÉDUCATION DES CELLULES NK (1)



RI autologue présent:
cellule NK fonctionnelle

RI autologue absent:
cellule NK **non** fonctionnelle

pas de HLA classe I
dans l'environnement:
cellule NK **non** fonctionnelle

 HLA de classe I

ÉDUCATION DES CELLULES NK (2)

jusqu'à 20 % des cellules NK n'expriment pas de RI pour les molécules HLA de classe I de l'individu

ces cellules sont hyporéactives

(pas de cytotoxicité, seulement faible production de cytokines)

ainsi, paradoxalement:

les cellules NK doivent exprimer un RI pour devenir actives et fonctionnelles

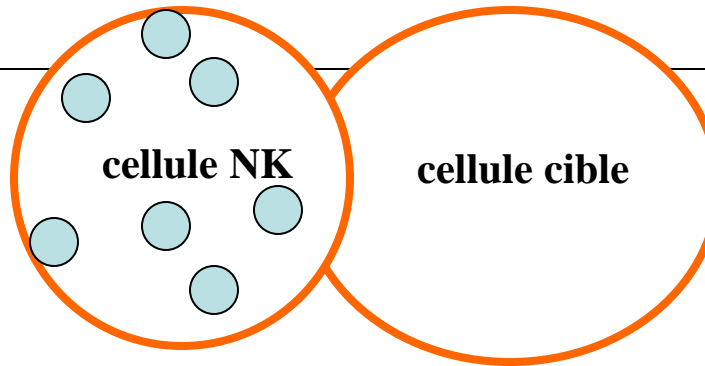
dans le déficit en TAP, les récepteurs sont présents mais pas leurs ligands (molécules HLA de classe I)



mêmes conséquences?

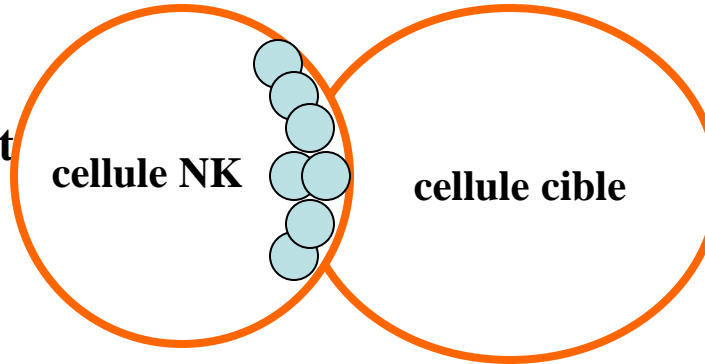
DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA CYTOTOXICITÉ

1) formation de conjugués



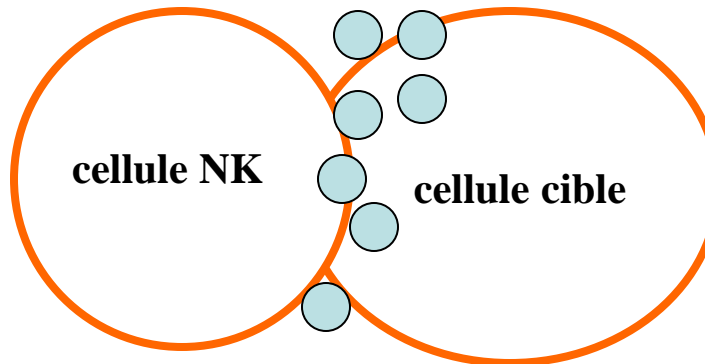
rôle des
molécules d'adhésion

2) les granules cytotoxiques migrent vers l'interface entre les deux cellules (synapse immunologique)



prédominance de
messages activateurs

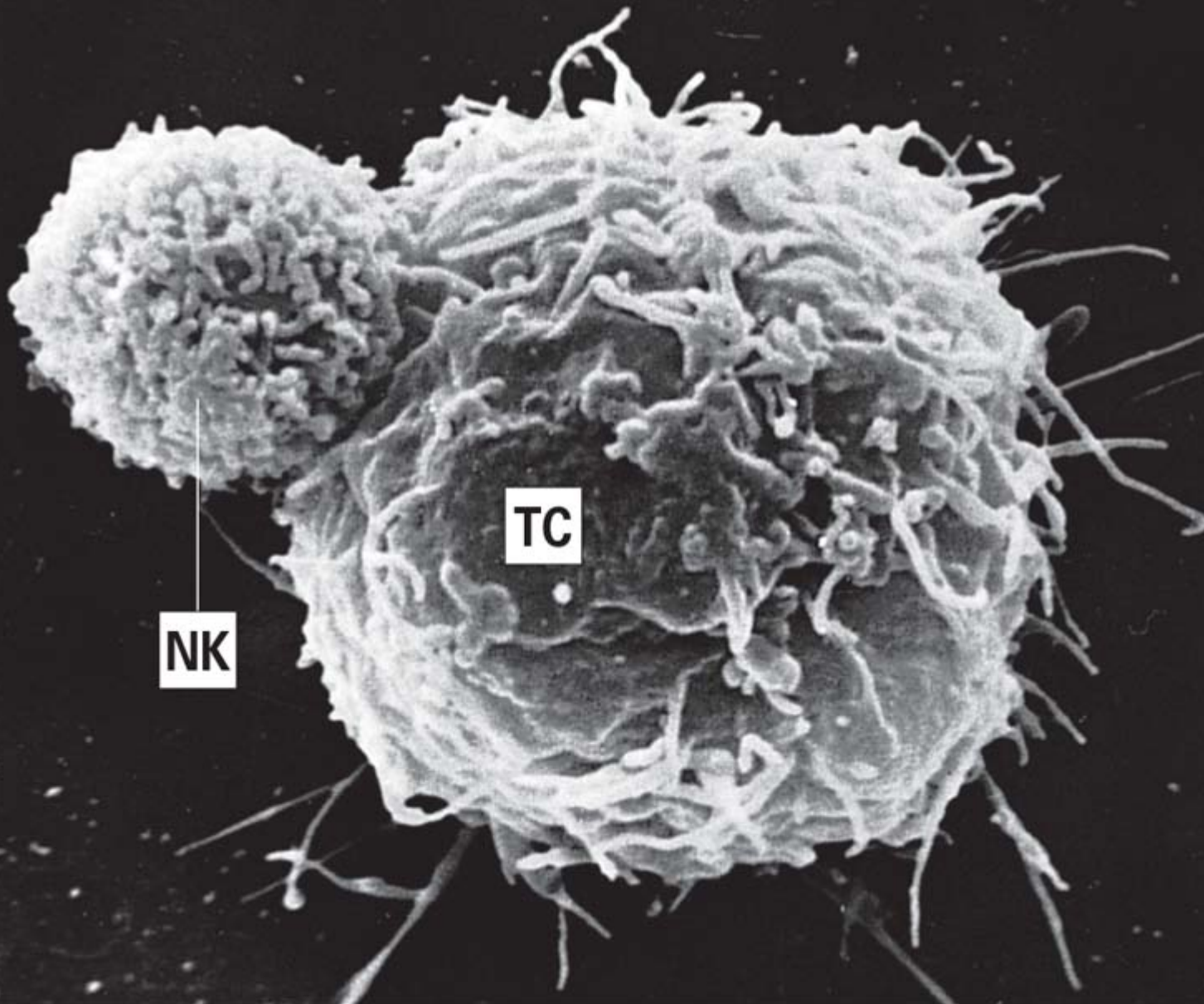
3) sécrétion des granules cytotoxiques



perforine, granzymes,
granulysine:
apoptose (mort)
de la cellule cible

An NK cell attached to a target cell

NK: cellule NK
TC: cellule cible



Male et al: Immunology, 8e
Copyright © 2013, 2006, 2001 by Elsevier Ltd.

MESURE DE LA CYTOTOXICITÉ

principe:

- cellules cibles (p.ex. K562, lignée leucémique sans molécules HLA de classe I) sont marquées par le colorant fluorescent CFSE
- incubation pendant 4 heures avec des cellules NK
- cytométrie en flux après addition de TOPRO 3, un marqueur de cellules mortes
- le pourcentage des cellules CFSE+ TOPRO 3+ correspond au pourcentage de cellules cibles mortes (pourcentage de lyse)

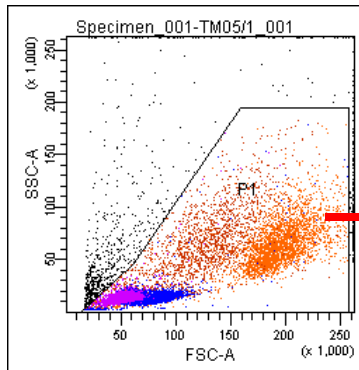
autres possibilités:

test de libération du Chrome 51 (isotope radioactif):
pas très sain pour le chercheur
accumulation de déchets radioactifs

test de libération de la LDH (enzyme intracellulaire):
libération mesurée par ELISA
plus laborieux que la cytométrie en flux

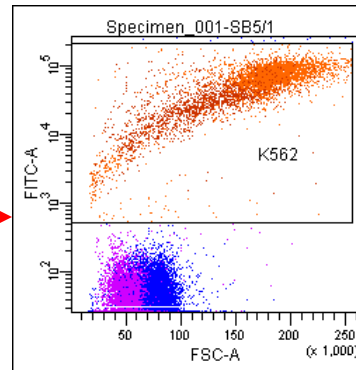
TEST DE CYTOTOXICITÉ PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX - EXEMPLE

cellules NK humaines comme effecteurs et cellules K562 comme cibles



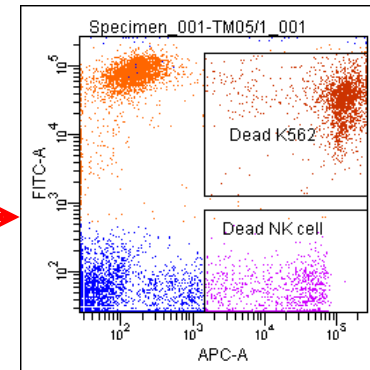
exclusion des débris

région P1



les cellules CFSE + sont les cellules cibles

les cellules CFSE- sont les cellules NK



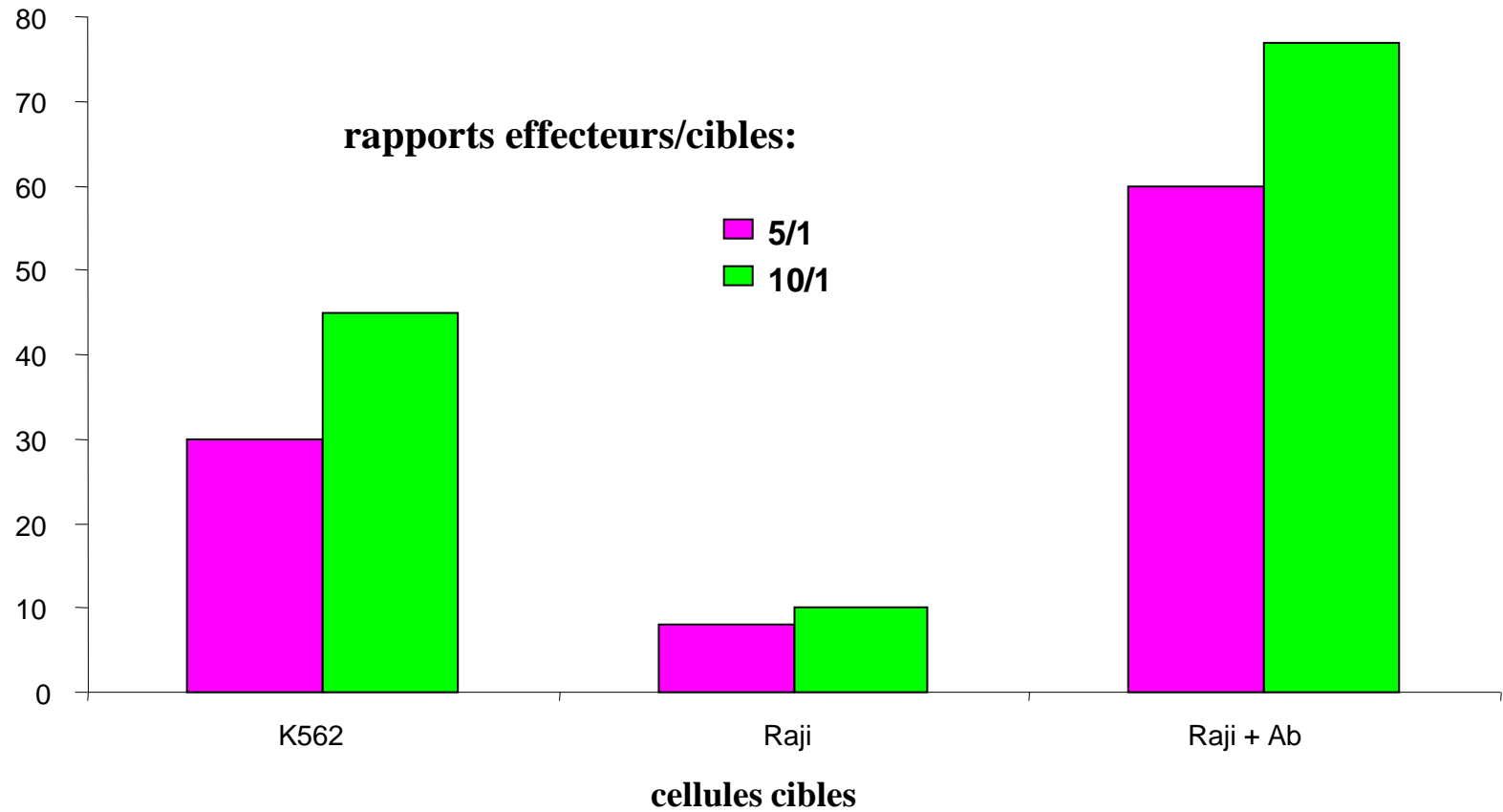
les cellules doublement + (CFSE+ / TOPRO 3+) sont les cellules cibles mortes

les cellules CFSE- TOPRO 3+ sont les cellules NK mortes

au moins 2000 cellules cibles sont examinées par échantillon

CYTOTOXICITÉ *EX VIVO* DES CELLULES NK

% de lyse



l'activité cytotoxique des cellules NK est stimulée par beaucoup de cytokines

interleukines (IL) -1, -2, -6, -7, -10, -12, -15, -18, -21

interférons (IFN) - α , - β , - γ

TNF- α

conséquences:

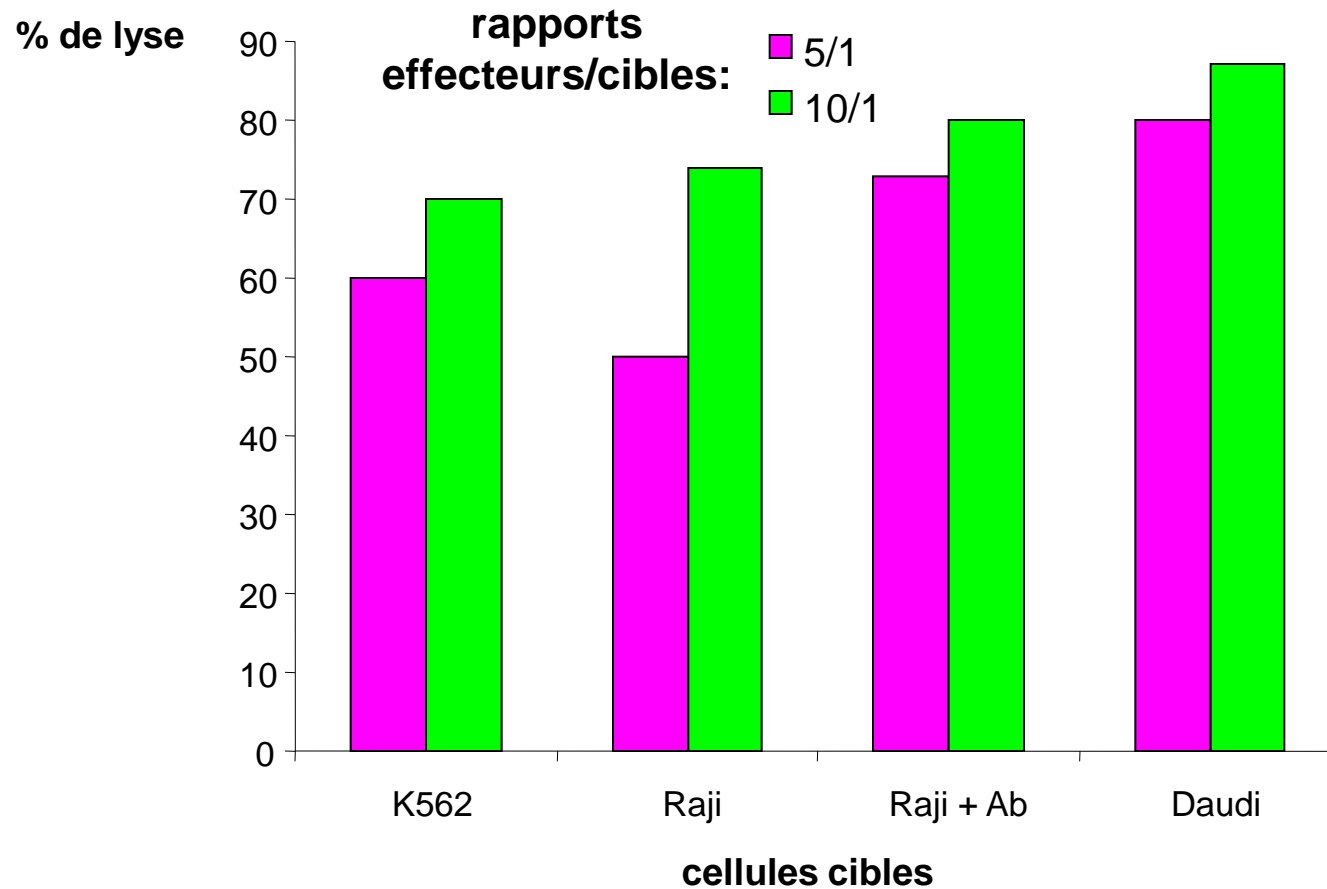
lyse plus forte des cibles déjà tuées par les cellules NK *ex vivo* (K562,

lyse de cibles résistantes aux cellules NK *ex vivo* (Raji, Daudi,.....)

IL-2 et IL-15 stimulent aussi la prolifération des cellules NK

cytokines inhibitrices de la cytotoxicité:

TGF- β , GM-CSF



PRODUCTION DE CYTOKINES PAR LES CELLULES NK

après activation par d'autres cellules (cellules dendritiques, macrophages, cellules cibles) ou après stimulation par des cytokines (CK), les cellules NK produisent et sécrètent elles-mêmes différentes CK

tout d'abord l'IFN- γ

mais aussi:

IL-3, -5, -8, -10, -13
TNF- α , TGF- β , GM-CSF

types et quantités des CK produites dépendent

- ° des conditions de stimulation
- ° des CK présentes dans l'environnement
- ° du niveau d'activation des cellules NK

étant donné que les cellules NK sont cytotoxiques *in vitro* contre les cellules tumorales, il est envisageable de les utiliser comme traitement anti-cancéreux

différentes possibilités:

- * injection de fortes doses d'interleukine 2 (IL-2)
 - ° effets secondaires majeurs (vascular leakage syndrome)
 - ° très peu d'efficacité thérapeutique
- * cellules NK autologues traitées *in vitro* par l'IL-2 puis réinjectées au patient avec de faibles doses d'IL-2
 - ° inefficace car cellules NK inhibées par les cellules tumorales (autologues)
- * cellules NK allogéniques (d'un donneur non histocompatible avec le patient)
 - ° greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques à des patients atteints de leucémie myéloïde aigüe
 - ° élimination des cellules leucémiques par les cellules NK issues de la greffe (graft *versus* leukemia effect),
 - ° amélioration du pronostic et moins de rechutes

l'effet de beaucoup d'anticorps anti-tumeurs déjà utilisés en clinique (p.ex. le rituximab) repose sur une forte ADCC effectuée par les cellules NK

l'utilisation d'anticorps bloquant les RI (KIR) est également prometteuse:

- l'interaction des KIR des cellules NK avec les molécules HLA de classe I des cellules tumorales est interrompue et la cellule NK ne reçoit plus de messages inhibiteurs

thalidomide, lenalidomide et pomalidomide:

- activation globale des cellules NK et des lymphocytes T
- propriétés anti-inflammatoires (inhibition de la production de TNF- α)
- effet anti-angiogénique
- frein à la croissance tumorale

bortezomib:

- inhibition de la dégradation des protéines endogènes dans les cellules
- conséquence: diminution de l'expression des molécules HLA de classe I
- lyse des cellules tumorales par les cellules NK est favorisée

GLIOBLASTOME (1)

le glioblastome (GBM) est la tumeur primitive la plus courante et la plus maligne des cancers du système nerveux central chez l'adulte

survie médiane seulement de 14 – 15 mois après le diagnostic, et ceci malgré une lourde trithérapie:

- ° chirurgie
- ° radiothérapie
- ° chimiothérapie au temozolomide

rechute inévitable, donc il existe un besoin urgent pour de nouvelles approches thérapeutiques – immunothérapie?

50 % des GBM expriment la molécule NG2, qui est un marqueur de pronostic pour une survie encore plus courte

approche:

- ° modèle animal (rat): implantation intracrânienne de lignées humaines de GBM
- ° utilisation d'un anticorps anti-NG2 et de cellules NK de rat activées pour induire une ADCC
- ° comparaison de l'efficacité de l'anticorps seul ou des cellules NK seules avec la bithérapie

MACROPHAGES

- macrophages présents dans tous les tissus et désignés par différents noms:
 - cellules de Kupffer (foie)
 - microglie – système nerveux central
 - ostéoclastes – os
 - macrophages alvéolaires – poumon
- l'environnement tissulaire spécifique détermine morphologie et fonctions
- fonctions des macrophages:
 - ingestion et destruction de microbes (phagocytose)
 - ingestion de cellules trop vieilles ou mortes (« cleaning up »)
 - production de cytokines:
 - * ***pour instruire le système immunitaire sur le danger***
 - * ***pour stimuler et amplifier la réponse immunitaire***
 - présentation d'antigènes aux lymphocytes T
 - réparation de tissus endommagés par
 - * ***angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins)***
 - * ***synthèse de la matrice extracellulaire riche en collagène***

GLIOBLASTOME (2)

la double thérapie a plus d'effets bénéfiques que les deux monothérapies:

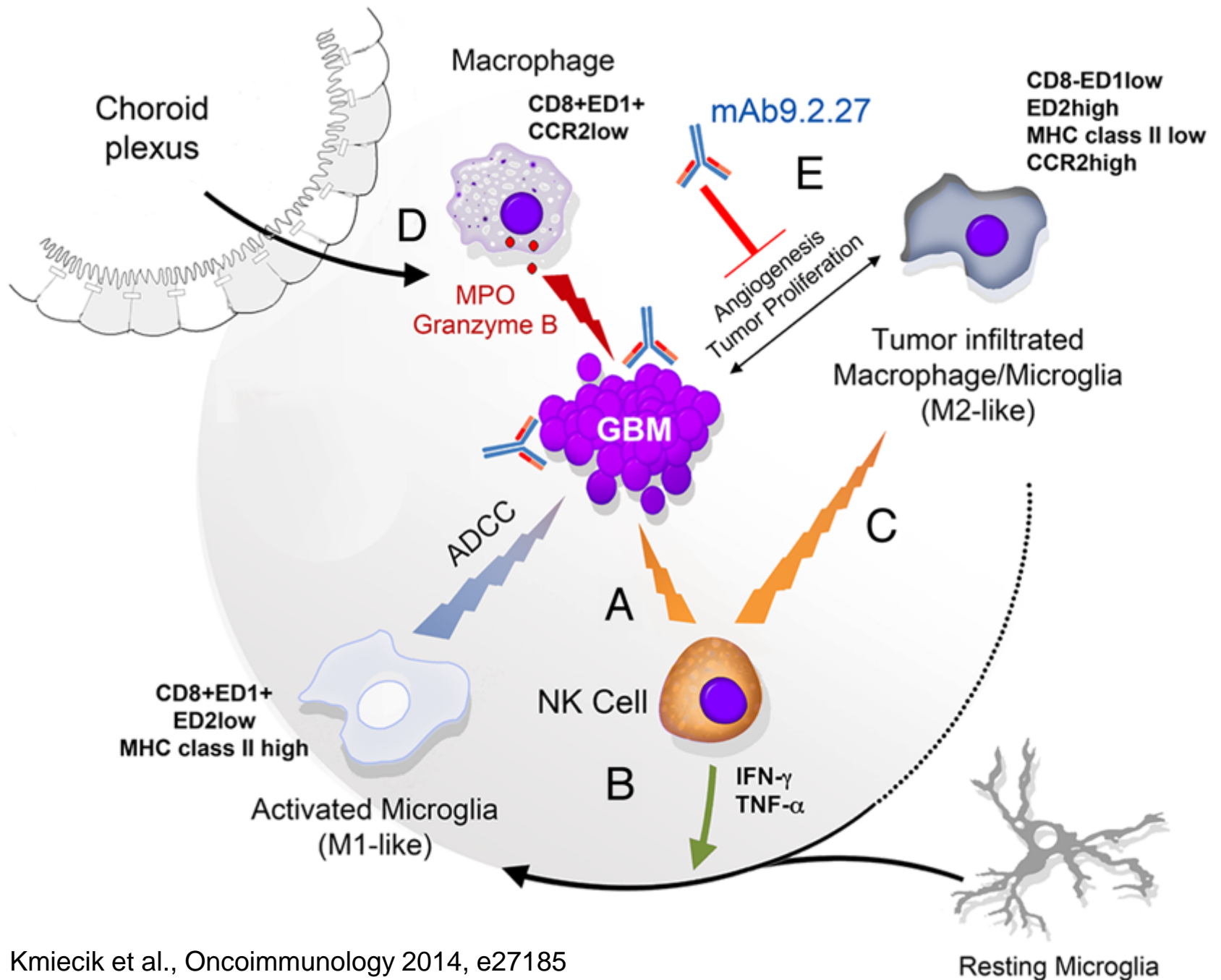
- ° croissance et prolifération des tumeurs sont réduites
- ° il y a un plus grand nombre de cellules tumorales mortes (apoptotiques)
- ° **survie prolongée** statistiquement significative (médiane de 91 jours comparée à 52, 44 et 39 jours pour l'anticorps seul, les cellules NK seules et l'absence de traitement, respectivement)

or, les cellules NK ne sont pas très cytotoxiques contre les cellules du GBM, même en présence de l'anticorps (peu d'ADCC)

mais les cellules NK produisent la CK IFN- γ qui active les macrophages infiltrant la tumeur

ceci crée un environnement pro-inflammatoire permettant l'élimination des cellules tumorales

en présence de l'anticorps, les macrophages sont fortement cytotoxiques contre les cellules GBM



LES CELLULES NK DANS L'ACCIDENT VASCULAIRE CÉRÉBRAL

AVC - hypoxie cérébrale - activation du système immunitaire

AVC - accumulation de cellules NK périphériques dans les zones ischémiques

souris sans cellules NK:

- ° ischémie moins étendue
- ° déficits neurologiques moins prononcés

cellules NK perdent la self tolerance contre les neurones ischémiques:

- ° chute de l'expression du ligand du RI NKG2A
- ° forte activation par surexpression du RA NKG2D

la perforine (cytotoxicité) et l'IFN- γ (milieu pro-inflammatoire) sont nécessaires pour les effets délétères des cellules NK

LES CELLULES NK: UNE ARME À DOUBLE TRANCHANT

ainsi, dans le SNC, les cellules NK peuvent avoir des effets bénéfiques et des effets délétères, selon la maladie en cause et le modèle expérimental choisi

l'action pro-inflammatoire est importante et positive dans le traitement des GBM, mais très négative lors des AVC

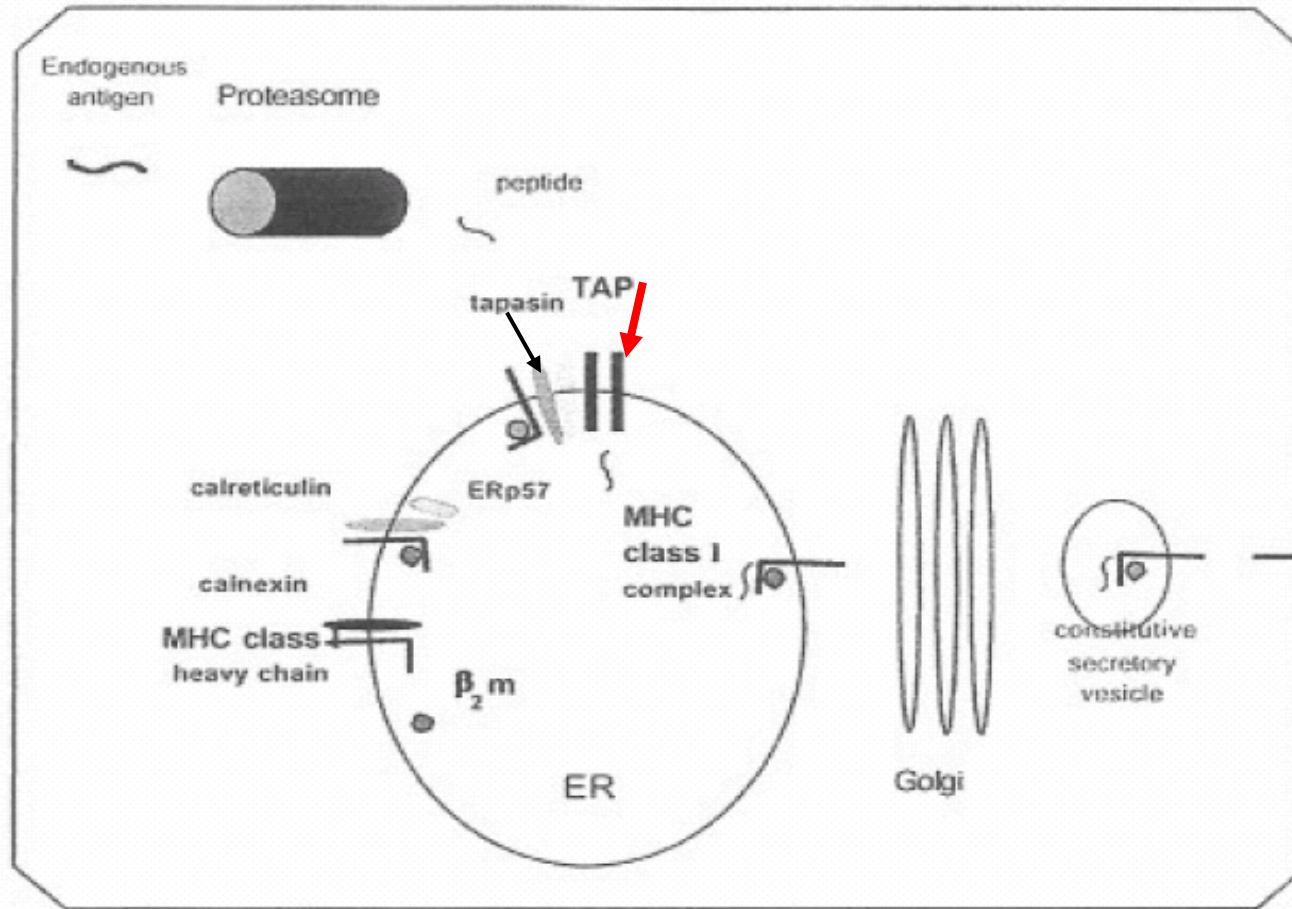
la même opposition (« good guys, bad guys ») existe dans:

- ° les septicémies (choc septique, infection du sang par des germes pathogènes)
- ° les infections en général (cellules NK nécessaires à la survie ou au contraire marqueurs de mauvais pronostic, avec beaucoup de situations intermédiaires)

les cellules NK peuvent théoriquement être bénéfiques dans beaucoup de maladies, mais leur utilisation préclinique et clinique doit inciter les chercheurs et les médecins à une grande prudence (« handle with care »)

**LE DÉFICIT EN TAP
(TRANSPORTER ASSOCIATED
WITH ANTIGEN PROCESSING)**

SÉQUENCE BIOCHIMIQUE DE LA SYNTHÈSE DES MOLÉCULES HLA DE CLASSE I



molécule HLA de classe I
d'expression stable car
peptide présent

DÉFICIT HUMAIN EN TAP

maladie génétique (autosomale récessive), environ 30 cas décrits

mutation homozygote dans le gène TAP1 ou le gène TAP2

très faible (1-10 % de la normale) expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules

sur le plan clinique, infections respiratoires bactériennes chroniques, bronchectasies, lésions ulcéreuses de la peau, destruction du cartilage nasal

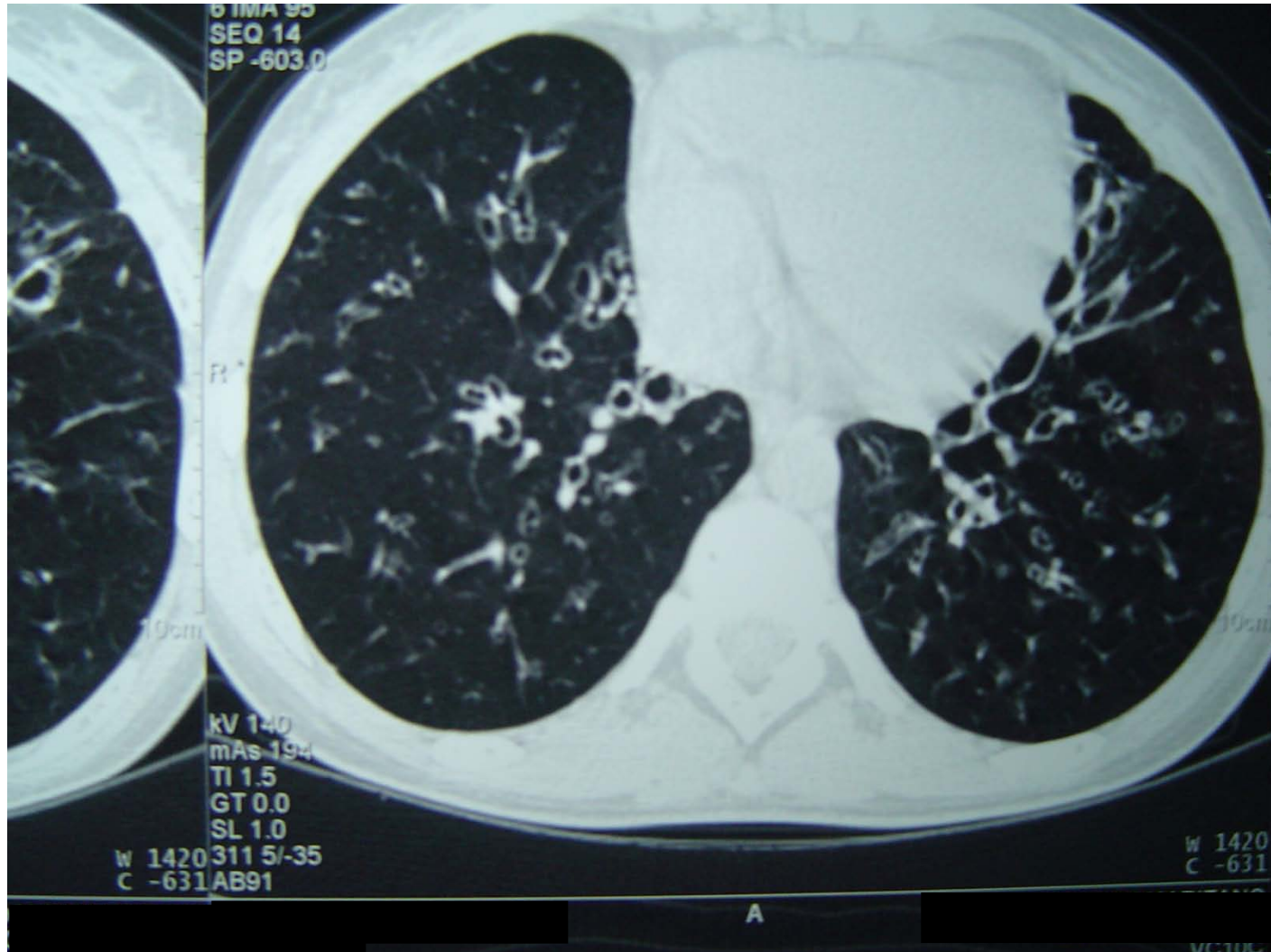
faible nombre de lymphocytes T CD8+ (qui ont besoin des molécules HLA de classe I pour se développer normalement)

les fonctions des cellules NK sont régulées par ces molécules, donc:

qu'en est-il des cellules NK dans le déficit en TAP?

hypothèse: elles sont hyporéactives car les molécules HLA de classe I sont très réduites dans l'environnement (éducation impossible)

BRONCHECTASIES DANS LE DÉFICIT EN TAP



LÉSIONS CUTANÉES DANS LE DÉFICIT EN TAP (1)



LÉSIONS CUTANÉES DANS LE DÉFICIT EN TAP (2)



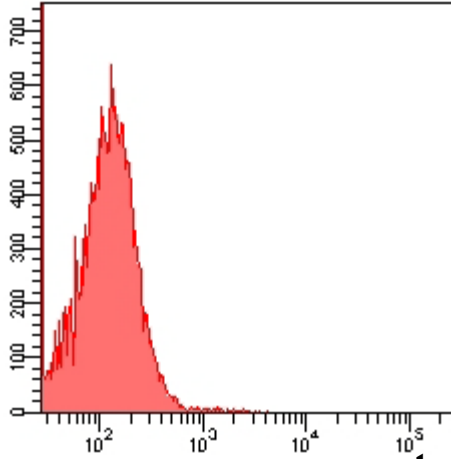
LÉSIONS CUTANÉES DANS LE DÉFICIT EN TAP (3)



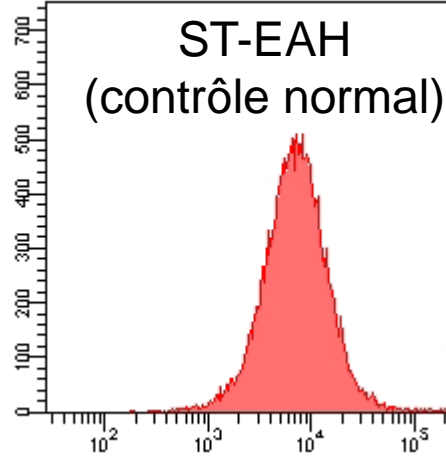
LÉSIONS CUTANÉES DANS LE DÉFICIT EN TAP (4)



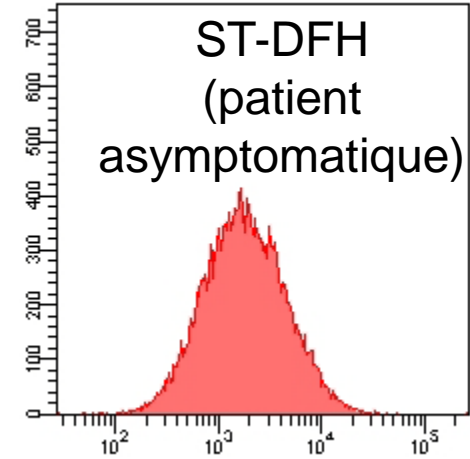
EXPRESSION DES MOLÉCULES HLA DE CLASSE I DANS LE DÉFICIT EN TAP



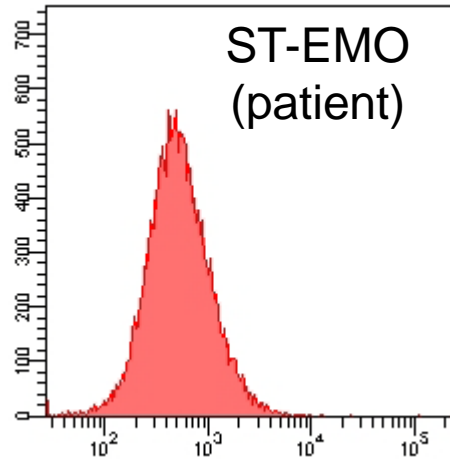
contrôle
négatif



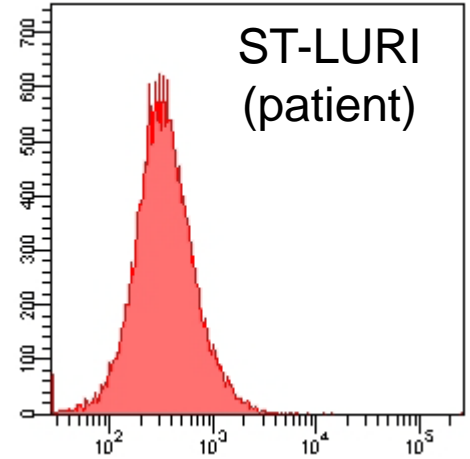
ST-EAH
(contrôle normal)



ST-DFH
(patient
asymptomatique)



ST-EMO
(patient)



ST-LURI
(patient)

mesure par cytométrie en flux

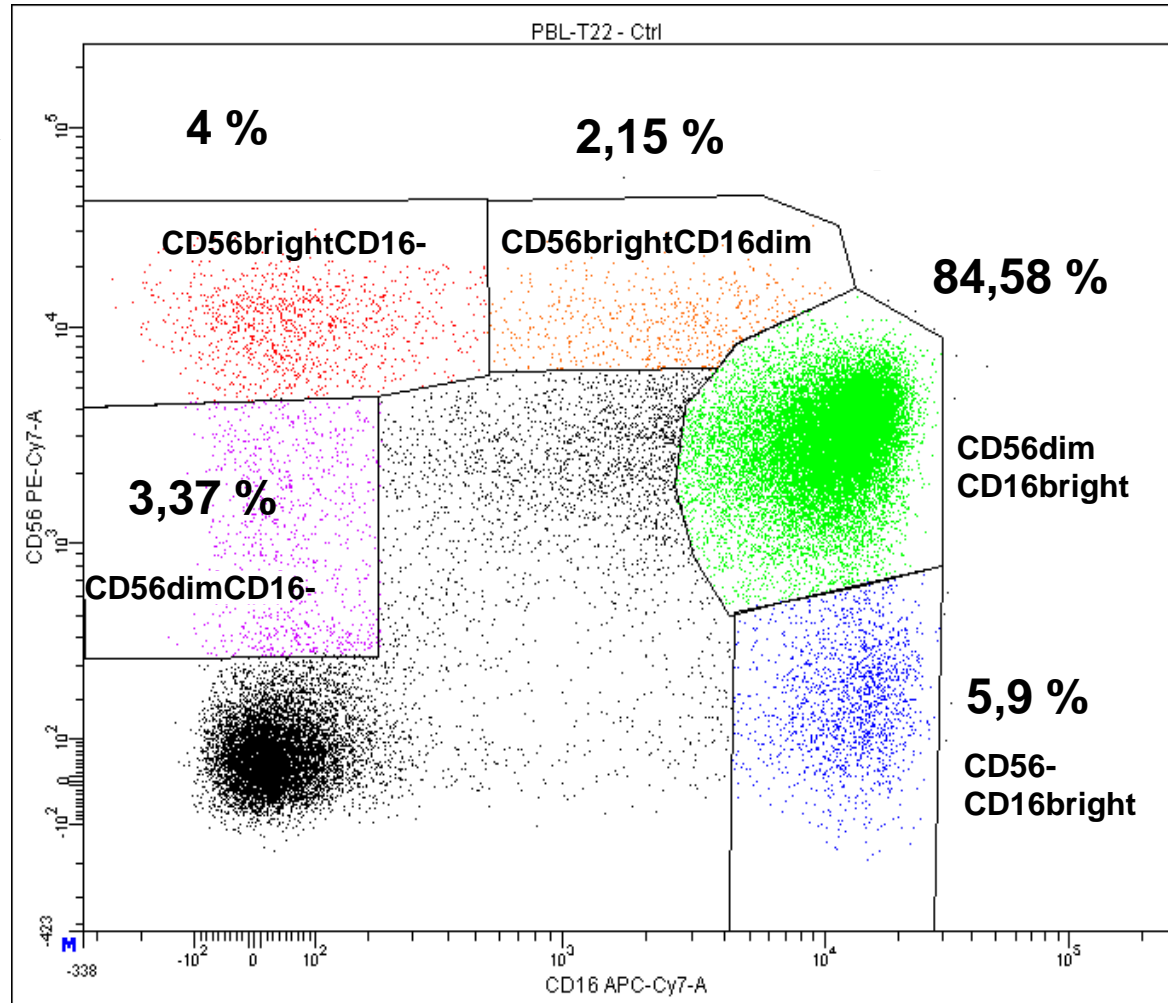
W6/32: anticorps reconnaissant
toutes les molécules
HLA de classe I

W6/32

W6/32

DIFFÉRENTES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES NK (1)

CD56-PE/Cy7

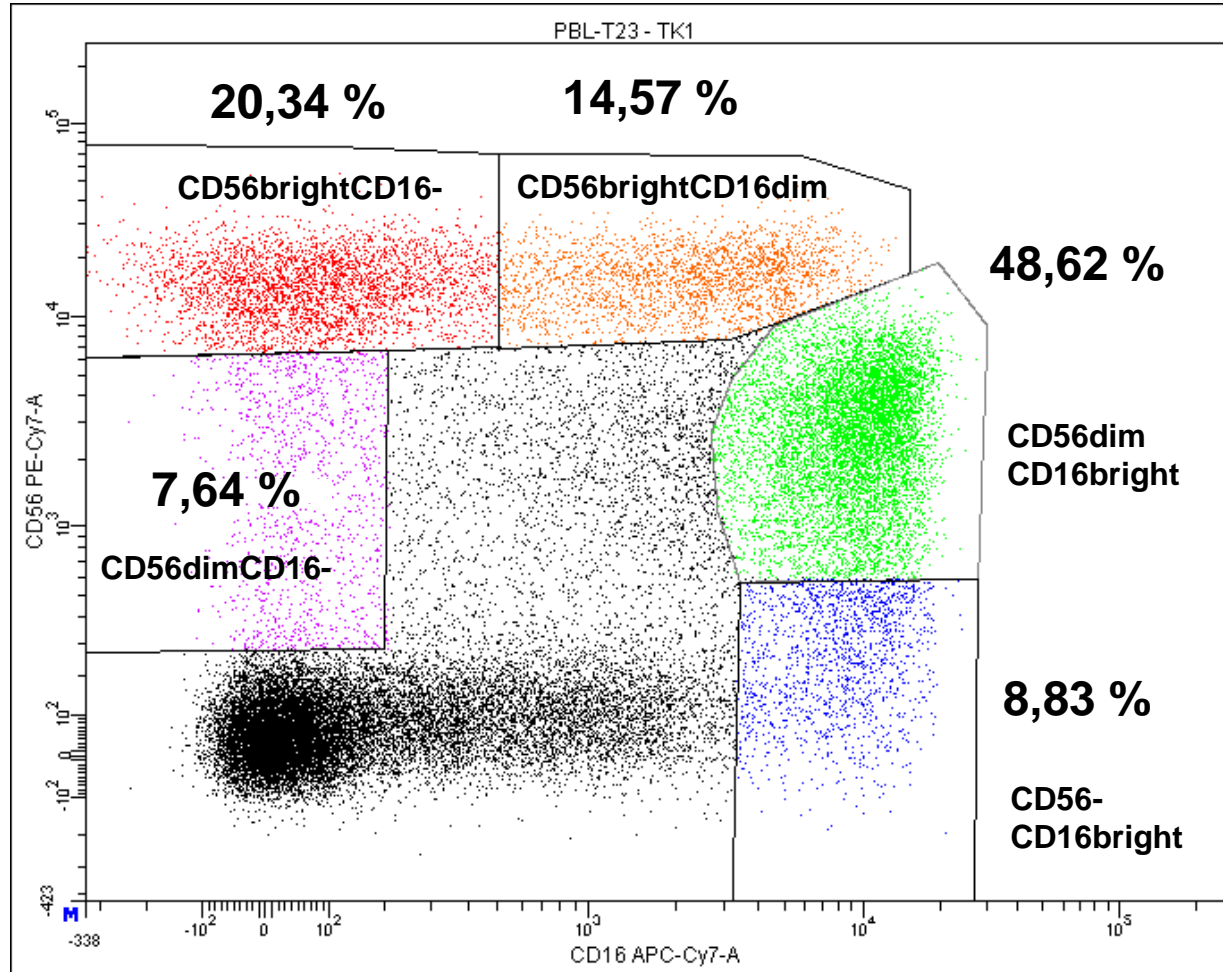


donneur
normal

CD16-APC/Hy7

DIFFÉRENTES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES NK (2)

CD56-PE/Cy7



patient
TAP-
déficient

CD16-APC/Hy7

PHÉNOTYPE DES CELLULES NK DANS LE DÉFICIT EN TAP

fort pourcentage de cellules NK CD56^{bright}

30 – 50%, < 10 % chez les donneurs sains

expression normale des récepteurs activateurs

NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD16

expression des récepteurs inhibiteurs des molécules HLA de classe I

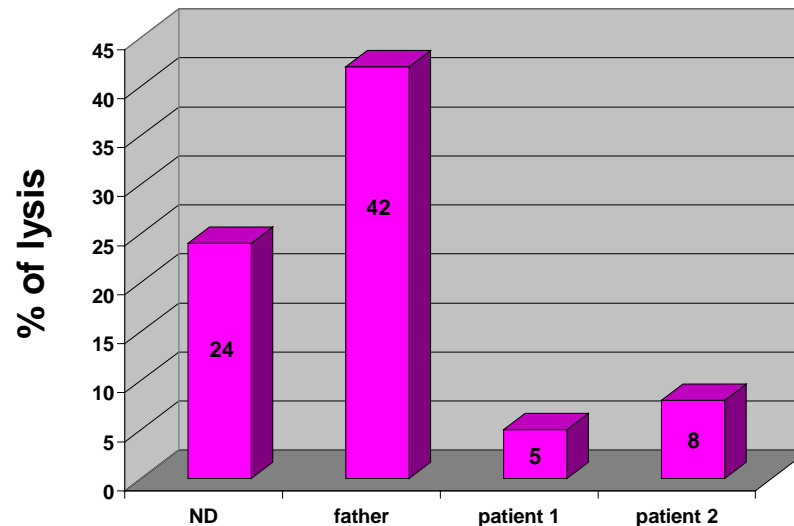
KIR, ILT2, NKG2A

niveau d'expression des récepteurs inhibiteurs

normal pour les KIR, surexpression de NKG2A et d'ILT2

cellules NK ex vivo (non éduquées):

- pas de cytotoxicité contre K562 (pas de reconnaissance du missing self)
- pas de cytotoxicité contre les lymphocytes B autologues (tolérance au self)
- ADCC présente mais très faible par rapport aux cellules NK normales

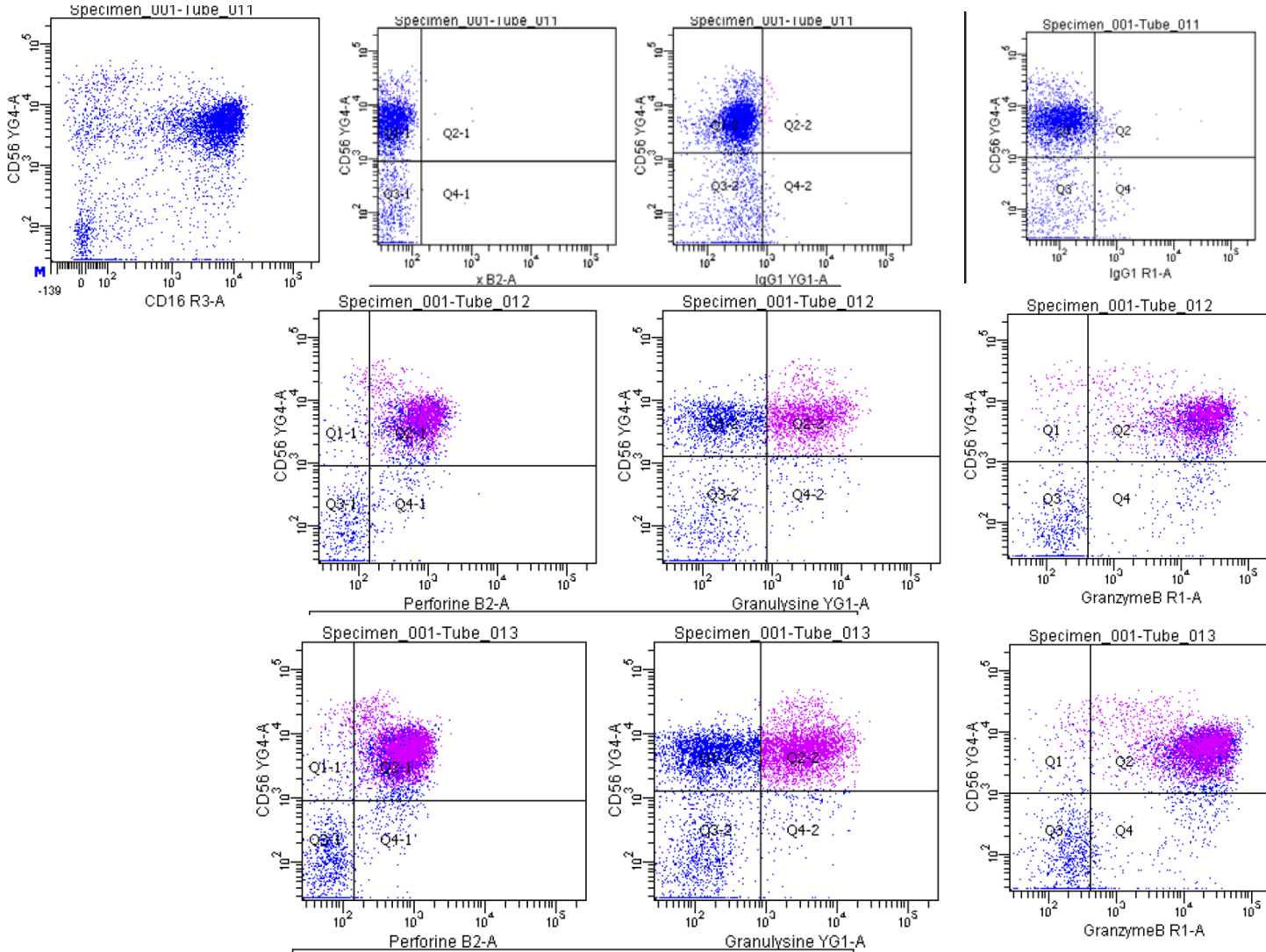


cible: K562
rapport E/C: 20/1

cellules NK activées (éduquées):

- stimulation avec IL-2 et lymphocytes B infectés par le virus d'Epstein-Barr
- expansion faible et lente par rapport aux cellules NK normales
- cytotoxicité présente contre K562, Raji, Daudi
- cytotoxicité présente contre les lymphocytes B autologues (rupture tolérance)
- forte ADCC

EXPRESSION DES MOLÉCULES CYTOLYTIQUES DANS LES CELLULES NK HUMAINES



contrôles négatifs
(pas d'anticorps spécifiques)

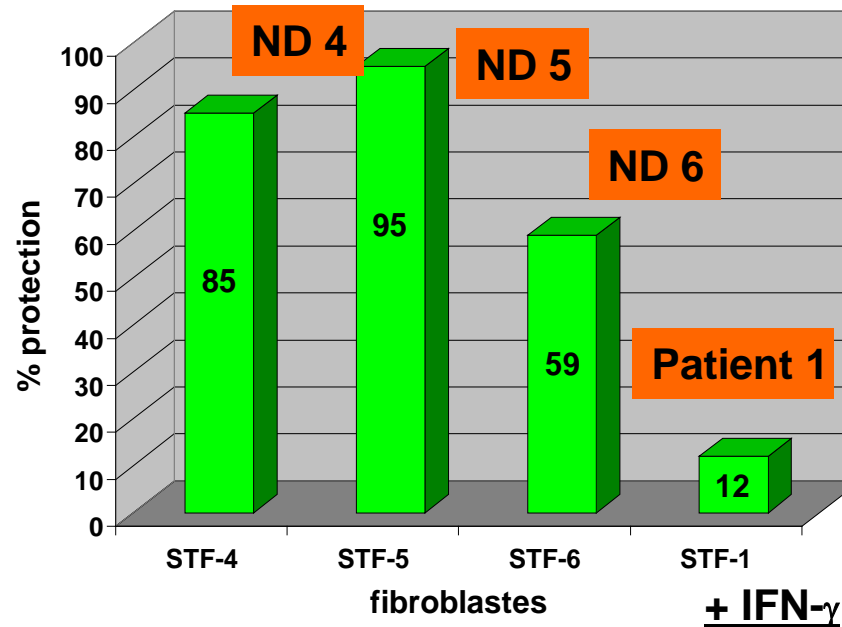
donneur normal

patient

ÉTUDES FONCTIONNELLES (2)

cellules NK activées et fibroblastes (FB)

- FB normaux de peau cultivés avec des cytokines (IFN- α , IFN- γ \pm TNF- α)
- forte augmentation de l'expression des molécules HLA de classe I
- résistance aux cellules NK activées autologues
- FB TAP-déficients: très faible augmentation des molécules HLA de classe I
- pas de résistance à la lyse par les cellules NK activées autologues



systemes autologues
rapport E/C: 5/1

cellules NK TAP-déficientes:

- fort pourcentage de cellules NK CD56^{bright}
ceci n'est pas spécifique du déficit en TAP; lié aux infections?
- phénotype plus ou moins normal, RI et RA sont fonctionnels
- cellules NK non activées (*ex vivo*) sont hyporéactives car non éduquées
- forte densité d'expression de NKG2A et d'ILT2, mais pas des KIR
surexpression limitée aux récepteurs à large spectre de ligands?
- cellules NK activées sont fonctionnelles
rôle dans les réponses immunitaires contre les virus?
- cellules NK activées sont auto-agressives (rupture de la self tolerance)
contributions aux manifestations cliniques?

REMERCIEMENTS

Projet TAP:

Aurélie POLI, PhD
Marwan SLEIMAN, étudiant PhD
Maud THÉRÉSINE, technicienne

Projet Glioblastome:

Aurélie POLI, PhD
Justyna KMIECIK, PhD
Martha CHEKENYA, PhD
Université de Bergen, Norvège

Projet NK – Macrophages:

Tatiana MICHEL, PhD
Anthony DAMIOT, étudiant master
Olivia Domingues, technicienne