

INRS-Institut Armand Frappier

**PHÉNOTYPE, FONCTIONS ET DÉVELOPPEMENT  
DE CELLULES NKT NON RESTREINTES PAR CD1D**

Par  
Martin Giroux

Thèse présentée pour l'obtention  
du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en Immunologie et Virologie

Membres du jury d'évaluation

Dr. Suzanne Lemieux	Présidente du jury
Dr. Ali Ahmad	Examineur externe
Dr. Walid Mourad	Examineur externe
Dr. François Denis	Directeur de recherche

Droits réservés de Martin Giroux, 2005

*Ceux qui ne peuvent se rappeler le  
passé sont condamnés à le répéter.*

George Santayana

## RÉSUMÉ

---

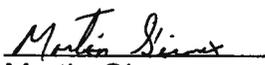
Une sous-population mineure de cellules T exprimant la molécule de surface CD56, un antigène marqueur des cellules NK, ont été classifiées comme étant des cellules NKT-like. Dans le sang périphérique humain ces cellules NKT, distinctes des cellules NKT classiques restreintes par CD1d, constituent environ 2 à 5 % des cellules mononucléaires totales. Ces cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> sont majoritairement CD8 positives et expriment le marqueur CD45RO des cellules T mémoires. La plupart des cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> expriment aussi d'autres récepteurs de type NK (NKR) tels CD57, CD161, CD94/NKG2, NKG2D et CD244. L'acquisition de NKR par ces cellules T pourrait moduler les réponses cellulaires. L'expression de NKR activateurs pourrait réduire le seuil d'activation requis lors de l'engagement du TCR et favoriser la reconnaissance de cellules tumorales et leur élimination. D'autre part, l'expression de NKR inhibiteurs pourrait être associée à une résistance accrue à la mort par apoptose et augmenter le seuil d'activation requis afin de réduire la cytotoxicité non spécifique envers le soi.

Dans un premier article, nous avons démontré que les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> peuvent recruter plusieurs types de cellules du système immunitaire inné (cellules NK, monocytes et neutrophiles). L'engagement du récepteur de mort Fas chez ces cellules NKT-like induit la sécrétion de chimiokines telles CCL5, CXCL1 et CXCL8. Ceci représente un nouvel exemple de signalisation non-apoptotique par les récepteurs de mort puisque la sécrétion des chimiokines dépend de l'activité des caspases bien que ces cellules soient réfractaires à l'apoptose.

Le deuxième article nous a permis de démontrer que la reconnaissance de la chaîne alpha du co-récepteur CD8 par certains anticorps nécessite la présence de calcium. Cet effet est visible dans les analyses par cytométrie en flux et n'est pas dû à l'internalisation du co-récepteur mais est plutôt

Finalement, dans le troisième article, puisque l'expression de NKR par des cellules T pourrait jouer un rôle important dans la tolérance ou la reconnaissance tumorale, cette population a été caractérisée en détail. Nous démontrons que les cellules  $CD3^+CD56^+$  peuvent être divisées phénotypiquement et fonctionnellement en 2 sous-groupes majeurs définis par leur niveau d'expression de CD3 et de CD94. Ces deux sous-groupes possèdent des capacités cytotoxiques et prolifératives différentes, les cellules  $CD3^{\text{élevé}}CD94^+$  étant plus actives dans les deux cas. Il est possible d'induire une différenciation *in vitro* de cellules  $CD94^+$  en cellules  $CD94^-$  en engageant le TCR, alors que la cytokine IL-15 accroît le contenu en perforine des cellules  $CD94^-$ . L'analyse des séquences CDR3 du TCR démontre que les cellules  $CD3^{\text{int}}CD94^-$  et  $CD3^{\text{élevé}}CD94^+$  sont phylogéniquement reliées. Une corrélation inverse entre l'abondance relative de cellules NKT  $CD3^+CD56^+$  et l'âge a été démontrée, ce qui pourrait avoir des conséquences dans les processus inflammatoires et la lutte anti-tumorale. Certains résultats suggèrent que les cellules NKT pourraient être auto-réactives.

Ces travaux nous aurons permis d'identifier une participation majeure des cellules NKT non-classiques dans le recrutement de cellules du système immunitaire inné suite à l'engagement de Fas ce qui représente un lien entre le système immunitaire acquis et inné. L'identification de deux sous-populations ayant une expression distincte de CD94 a permis de mieux comprendre l'ontogénie des cellules  $CD3^+CD56^+$ . Ce groupe de cellules NKT a probablement un rôle important à jouer dans la surveillance tumorale et les maladies inflammatoires.

  
Martin Giroux  
Étudiant

  
François Denis  
Directeur de recherche

## TABLE DES MATIÈRES

---

RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	2
Introduction .....	2
Apoptose.....	3
Apoptose vs nécrose.....	3
Récepteurs de mort.....	3
La voie de signalisation Fas-FasL.....	6
La molécule Fas Ligand.....	6
Clivage protéolytique de FasL .....	7
Le récepteur Fas.....	8
Mécanisme d'apoptose induite via Fas .....	8
Régulation de l'apoptose induite via Fas.....	11
Rôle des caspases.....	12
Rôle de FasL aux Sites Immunoprivilégiés .....	15
FasL et évation tumorale .....	15
Principe de l'immuno-privilège artificiel .....	16
Succès de l'immuno-privilège artificiel .....	16
Échecs de l'immuno-privilège artificiel.....	17
Mode d'action indirect de FasL.....	19
Signalisation non-apoptotique induite par FasL .....	20
Les molécules chimiotactiques .....	22
Les neutrophiles .....	25

Les Cellules Natural Killer.....	26
Activation cellulaire.....	27
Cytotoxicité.....	28
Reconnaissance du soi .....	29
Les récepteurs de cellules natural killer .....	30
Les killer cell immunoglobulin-like receptors.....	33
Les leukocyte immunoglobulin-like receptors .....	33
Les récepteurs hétérodimériques CD94/NK membrane-bound protein group 2 .....	34
Le récepteur homodimérique NKG2D.....	34
Les natural cytotoxicity receptors.....	35
CD244 .....	36
CD56 et CD57 .....	37
Les natural killer receptor protein-1 .....	38
Autres cellules exprimant des récepteurs de cellules natural killer, les cellules TCR positives NKT .....	39
Les cellules NKT restreintes par CD1d .....	40
Historique.....	40
Caractéristiques des cellules NKT restreintes par CD1d.....	41
Les cellules NKT non restreintes par CD1d. ....	43
Les cellules T mémoires de type 1 .....	44
Les NKT-like intra-hépatiques.....	44
Les cellules cytokine induced killer .....	45
Les cellules T mémoires .....	46
Caractérisation des cellules T mémoires NKR positives .....	47
Phénotype des cellules T mémoires NKR positives .....	47
Rôle des cellules T mémoires NKR positives .....	48
Cellules T auto-réactives et extrathymiques.....	51
Relation entre l'âge et l'abondance des lymphocytes .....	53
CHAPITRE 2 ARTICLE I : CD1D-UNRESTRICTED HUMAN NKT CELLS RELEASE CHEMOKINES UPON FAS ENGAGEMENT.....	57

Mise en contexte du 1 <sup>er</sup> article .....	57
1 <sup>er</sup> article .....	58
CHAPITRE 3 ARTICLE II : TWO FUNCTIONALLY DISTINCT POPULATIONS OF HUMAN MEMORY T CELLS EXPRESSING NATURAL KILLER CELL MARKERS DIFFERENTIATED BY CD3 AND CD94 EXPRESSION.....	
	70
Mise en contexte du 2 <sup>e</sup> article .....	70
2 <sup>e</sup> article .....	71
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES NON PUBLIÉS .....	99
Identification d'une sous-population de NKT-like CD56 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD161 <sup>élevé</sup> .....	99
Expression de l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ par des NKT-like. ....	102
CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	107
Section I : Discussion de l'article I.....	108
CHAPITRE 6 CONCLUSION.....	120
CHAPITRE 7 REMERCIEMENTS.....	127
ANNEXE A. ARTICLE III : INFLUENCE OF CALCIUM IONS IN THE FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF HUMAN CD8-POSITIVE CELLS.....	
	131
Mise en contexte du 3 <sup>e</sup> article .....	131
article III .....	132
ANNEXE B : DISCUSSION DU 3 <sup>E</sup> ARTICLE .....	137
RÉFÉRENCES .....	140

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

- AA** : acide arachidonique
- ADN** : acide déoxyribonucléique
- AICD** : mort cellulaire induite par l'activation
- AITR** : activation inducible tumor necrosis factor receptor
- $\alpha$ -GalCer** : (2S, 3S, 4R)-1-O-( $\alpha$ -D-galactopyranosyl) -N-hexacosanoyl-2-amino  
1,3,4- octadecanetriol
- APAF** : apoptotic protease activating factor
- APC** : cellule présentatrice d'antigène
- APRIL** : a proliferation inducing ligand
- ARN** : acide ribonucléique
- ARNm** : ARN messenger
- ASK** : apoptosis signal-regulating kinase-1
- $\beta_2$ -m** : Beta2-microglobuline
- Bcl-2** : B cell leukemia oncogenes-2
- BCMA** : B cell maturation protein
- Bid** : BH3 interacting domain death agonist
- BIR** : baculoviral IAP repeat
- C** : protéine de la voie des compléments
- CIK** : cytokine induced killer
- CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité
- DAP** : DNAX activation protein
- DAXX** : death associated protein
- DcR** : decoy receptor
- DD** : domaine de mort
- DED** : Death Effector Domain
- DIABLO** : Direct IAP binding protein of low pI
- DISC** : death inducing signalling complex
- DMSO** : diméthyl sulfoxide
- DN** : double négatif (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)

**DP** : double positif (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)  
**EBV** : virus d'Epstein-Barr  
**EDA** : ectodysplasin-A  
**EDAR** : ectodysplasin-A receptor  
**EDTA** : acide d'éthylène-diamine-tétraacétique  
**ELR** : motif glutamate-leucine-arginine  
**ENA-78** : epithelial neutrophil activating peptide 78  
**ERK** : extracellular signal-regulated kinase  
**FACS** : fluorescence activated cell sorter  
**FADD** : Fas associated death domain  
**FasL** : Fas ligand  
**FLICE** : Fas-linked IL-1 $\beta$  converting enzyme like protease  
**FLIP** : FLICE inhibitory protein  
**GCP** : granulocyte chemotactic peptide  
**GM-CSF** : granulocyte-macrophage colony stimulating factor  
**GPCR** : G protein coupled receptor  
**GPI** : glycosyl-phosphatidyl-inositol  
**GRO** : growth regulated oncogene  
**VIH** : virus d'immunodéficience humaine  
**HLA** : human leukocyte antigen  
**HSV** : herpes simplex virus  
**HTLV-1** : human T-cell lymphotropic virus type 1  
**HVEM** : herpes virus entry mediator  
**H-Y** : souris TCR-transgénique envers l'antigène mâle H-Y  
**IAP** : inhibitor of apoptosis protein  
**ICE** : IL-1 $\beta$  converting enzyme  
**IEL** : lymphocytes intra-épithéliaux intestinal  
**IFN** : interféron  
**Ig** : immunoglobuline  
**IL** : interleukine  
**ILT** : immunoglobulin-like transcript

**int** : niveau intermédiaire

**IP-10** : IFN inducible protein-10

**ITAM** : immunoreceptor tyrosine-based activatory motif

**ITIM** : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

**JNK** : c-Jun N-terminal kinase

**KIR** : killer cell immunoglobulin-like receptor

**LAK** : lymphokine activated killer

**LAT** : linker for activation of T cells

**LCMV** : lymphocytic choriomeningitis virus

**LGL** : large granular lymphocytes

**LIGHT**: lymphotoxin-like with inducible expression competes with HSV glycoprotein for HVEM T cells

**LIR** : leukocyte immunoglobulin-like receptor

**Log** : logarithme

**LT** : leucotriène

**MAPK** : mitogen-activated protein kinase

**MCP** : monocyte chemoattractant protein

**mFasL** : FasL membranaire

**MIC** : CMH-I chain-related protein

**MIG** : monokine induced by IFN

**MIP** : macrophage inflammatory protein

**MMP** : métalloprotéase

**MPO** : myéloperoxydase

**NALP1** : NACHT (NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein)-CIITA (CMH-II transcription activator)-HET-E (incompatibility locus protein from *Podospira anserina*)-TP1 (telomerase associated protein)), LRR (leucine rich repeat) and pyrin domain -containing protein 1

**NAP** : neutrophil activating protein

**NCAM** : neural cell adhesion molecule

**NCR** : natural cytotoxicity receptor

**NF- $\kappa$ B** : nuclear factor-kappaB

**NGFR** : Nerve growth factor receptor  
**NK** : cellule Natural Killer  
**NKG2** : NK membrane-bound protein group 2  
**NKR** : récepteur de type NK  
**NKR-P1** : NKR Protein-1 (CD161)  
**NKT** : Natural Killer T cell  
**NKT-like** : cellule T NKR<sup>+</sup> non restreinte par CD1d  
**NOD** : souris non obèse diabétique  
**NT** : natural T cells  
**NUDE** : souris déficiente pour le gène NU (déficience thymique)  
**OPG**: osteoprotegerin  
**p56-lck** : 56 kDa lymphocyte cellular kinase  
**PG** : prostaglandine  
**PLC** : phospholipase C  
**PMA** : phorbol- 12-myristate 13-acétate  
**PML** : promyelocytic leukemia protein  
**PMN** : leucocyte polymorphonucléaire  
**PYCARD** : pyrin domain and caspase recruitment domain containing protein  
**RANK** : receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B  
**RANTES** : regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted  
**SAP** : SLAM associated protein  
**SCID** : souris ayant une immunodéficiência sévère combinée  
**SDF-1** : stromal cell derived factor-1  
**sFasL** : FasL soluble  
**SHP** : SH2 motif containing phosphatase  
**SLAM** : signaling lymphocytic activation molecule  
**TACI** : transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin interactor  
**TCR** : récepteur de cellule T  
**TIMP** : inhibiteur tissulaire des métalloprotéases  
**TL** : thymus Leukemia antigen  
**Tm1** : cellule T mémoire de type 1

**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor-alpha

**TNFRSF** : superfamille des récepteurs TNF

**TRAIL** : TNF-related apoptosis inducing ligand

**TREC** : signal-joint TCR rearrangement excision circles

**TWEAK** : tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis

## LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1. MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE DE TNF ET DE LEURS RÉCEPTEURS. ....	5
FIGURE 2. CASCADE APOPTOTIQUE INDUITE VIA FAS. ....	10
FIGURE 3. MEMBRES DE LA FAMILLE DES CASPASES. ....	14
FIGURE 4. EXPRESSION DE CD161 CHEZ LES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES T CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> . ....	100
FIGURE 5. EXPRESSION DU CO-RÉCEPTEUR CD8 CHEZ LES CELLULES T CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> . ....	105

## LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1. LISTE DES CHIMIOKINES EXPRIMÉES CHEZ L'HUMAIN .....	23
TABLEAU 2. LISTE DES NKR EXPRIMÉS SUR LES CELLULES NK ET NKT HUMAINES .....	31
TABLEAU 3. POURCENTAGE DE CELLULES T HUMAINES EXPRIMANT UN NKR.....	40

## ***1<sup>ère</sup> Partie : Revue de littérature***

### ***Chapitre 1 : Revue de littérature***

***Apoptose***

***Rôle de FasL aux sites immunoprivilégiés***

***Les cellules Natural Killer***

***Autres cellules exprimant des natural killer receptors***

***Relation entre l'âge et l'abondance des lymphocytes***

## CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

---

### **Introduction**

Avant de débiter cette revue de littérature, voici un bref aperçu des sujets abordés. Au départ, le projet de doctorat était orienté sur la fonction chimiotactique qui est peu caractérisée de la molécule pro-apoptotique FasL. La première section de cette revue de littérature introduit donc l'apoptose cellulaire, le rôle de la voie Fas-FasL, les mécanismes induisant l'apoptose initiée par les récepteurs de mort ainsi que la régulation de cette cascade pro-apoptotique. Par la suite seront introduits les concepts d'immunoprivilège et de l'utilisation de FasL pour induire la tolérance envers des greffes cellulaires. Par plusieurs exemples, le rôle pro-inflammatoire de FasL, notamment la sécrétion de chimioattractants, sera démontré ainsi que les mécanismes intracellulaires permettant cette fonction. Finalement, une brève description des neutrophiles et des molécules chimiotactiques pouvant être impliqués dans la chimioattraction par FasL sera présentée.

Pour mieux comprendre nos résultats, une vaste revue de la littérature a dû être entreprise et celle-ci est résumée dans la deuxième section de ce chapitre. Elle comprend les études effectuées sur les cellules NK et leurs récepteurs ainsi que les diverses populations de lymphocytes exprimant un récepteur de cellule T et de cellule NK (cellules NKT). Les caractéristiques des diverses populations de cellules NKT sont définies ainsi que leurs rôles et implications dans le système immunitaire.

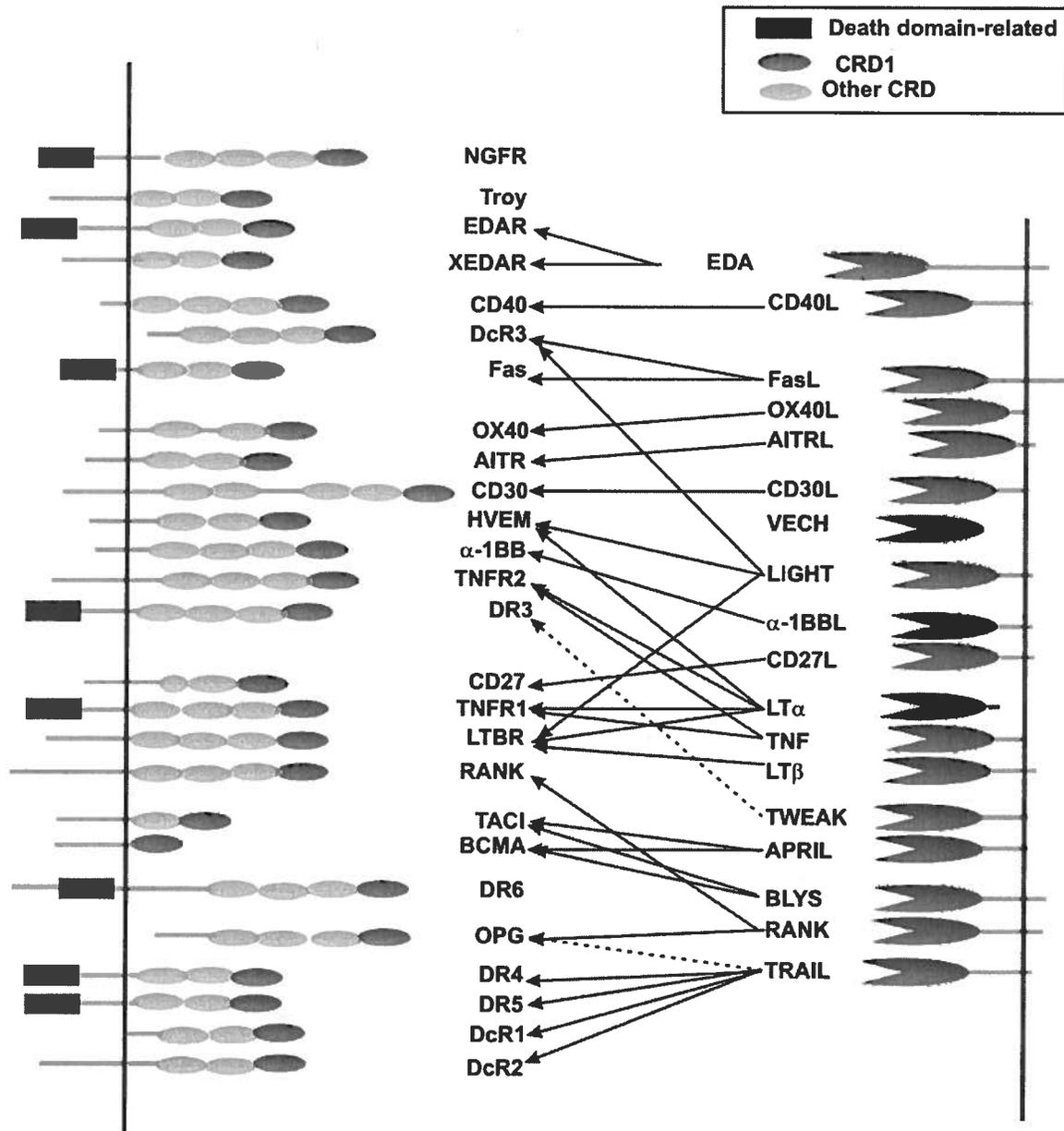
### **Apoptose vs nécrose**

Les cellules de notre corps ne sont pas éternelles et toutes meurent éventuellement. Deux formes de mort cellulaire sont discernables: la nécrose qui survient suite à des dommages physiques, et l'apoptose qui est une mort programmée. Dans les années 1980, les études de Horvitz sur le nématode *Caenorhabditis elegans* (1) ont fait naître le concept de mort génétiquement contrôlée. L'apoptose joue un rôle majeur dans le développement, l'homéostasie et les diverses fonctions du système immunitaire: elle permet l'élimination des cellules endommagées, infectées ou surnuméraires. La nécrose est considérée comme un processus chaotique et la cellule augmente de volume et sa membrane éclate répandant ainsi le contenu cytoplasmique vers le milieu extérieur, ce qui cause de l'inflammation. Au contraire de la nécrose, la cellule apoptotique va graduellement rétrécir, condenser sa chromatine, perdre l'asymétrie membranaire plasmique, le noyau va se fragmenter et la cellule bourgeonne en corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules voisines (2, 3).

### **Récepteurs de mort**

Pour échapper à l'apoptose, les cellules doivent constamment recevoir des signaux qui inhibent la voie apoptotique qui est toujours active. Les signaux induisant l'apoptose proviennent soit de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule. Alors que les signaux intrinsèques sont dus à des dommages comme les oxydants ou des dommages à l'ADN, les signaux extrinsèques proviennent de cellules avoisinantes et sont transmis par des récepteurs spécifiques nommés récepteurs de mort.

Les récepteurs de mort sont structurellement similaires et forment la superfamille des récepteurs TNF (TNFRSF) qui compte 29 membres dont la fonction d'une dizaine a été bien caractérisée, soit TNFR1 (CD120a), TNFR2 (CD120b), Fas (CD95), CD40, CD27, CD30, OX40 (CD134), DcR1, DcR2, DR3, DR4 et DR5 et 4-1BB (CD137) (Figure 1) (4, 5). Les trois ligands des récepteurs de mort les plus étudiés sont TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), TNF et FasL, et la voie de signalisation Fas-FasL joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie du système immunitaire (6).



**Figure 1. Membres de la Superfamille de TNF et de leurs récepteurs.**

Représentation schématique des TNFRSF et de leurs ligands TNFSF. La présence de DD (death domain) chez certains récepteurs ont été mis en évidence ainsi que la présence de CRD (cysteine rich domain). Les liaisons ligand-récepteur sont illustrées par des flèches pleines et les liaisons présumées par des flèches pointillées (tiré de Locksley, R.M. et al., Cell 2001 (5), avec la permission de Elsevier).

## **La voie de signalisation Fas-FasL**

### La molécule Fas Ligand

FasL peut se retrouver sous forme de monomère, dimère ou trimère (7). Bien que la structure cristallographique de FasL n'ait pas encore été déterminée, celles d'autres membres de la famille TNF (CD40L (8), TNF- $\alpha$  (9) et TRAIL (10) révèlent que les trimères se forment par interactions hydrophobes et que les boucles d'acides aminés exposées sont responsables des interactions avec le récepteur (8-11). Les formes trimériques sont nécessaires pour enclencher l'apoptose en induisant l'oligomérisation des récepteurs de mort. La protéine TRAIL a la caractéristique de posséder une cystéine impliquée dans la formation de dimères par la formation d'un pont disulfure interchaîne (12). Cette cystéine peut aussi participer à la formation de trimères par la coordination d'un atome de zinc au centre de la structure (13). Puisque FasL possède une cystéine à une position similaire, celle-ci pourrait aussi être impliquée dans la formation de trimères et/ou de dimères.

La voie Fas-FasL est fréquemment impliquée dans l'apoptose induite par contact intercellulaire. Identifié et caractérisé dans le laboratoire de Shigekazu Nagata (14, 15), FasL, aussi nommé APO-1 Ligand, TNFSF member 6 ou CD178, est une protéine membranaire de type II (région N-terminale située dans le cytoplasme). Son expression est restreinte à certains types cellulaires dont les lymphocytes T, et chez ces cellules l'expression de FasL est inductible et est fortement augmentée suite à l'engagement du TCR (16). Cette expression permet d'induire l'activation induced cell death (AICD) et joue un rôle majeur dans l'homéostasie des lymphocytes activés. Chez les cellules T et les cellules natural killer (NK), des microvésicules pré-formées contiennent des niveaux élevés de FasL qui peuvent être exocytosées suite à une stimulation (17, 18). Chez les cellules T et NK, FasL est aussi exprimé directement à la surface cellulaire. Les cellules épithéliales des sites immunoprivilégiés expriment aussi

FasL. Ces sites essentiels à la survie de l'espèce restreignent l'entrée des cellules du système immunitaire pour réduire les réactions inflammatoires qui pourraient avoir de fâcheuses conséquences. Ainsi, la cornée de l'œil, les cellules de Sertoli des testicules et les trophoblastes du placenta expriment tous FasL afin d'éliminer les cellules T activées pénétrant ces sites (19).

L'expression de FasL à la surface de cellules T activées est essentielle pour la résolution de l'inflammation. Lors de l'activation du système immunitaire, la mort des lymphocytes qui survient après leur activation (par AICD) est induite par FasL. La co-liaison du TCR et de CD28 active la cellule T et la rend aussi sensible à l'apoptose induite par FasL par l'augmentation de l'expression de Fas. Par contre la liaison de CD28 seul rend les lymphocytes résistants à l'apoptose puisque CD28 augmente les niveaux intracellulaires de la molécule anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> alors que la liaison du TCR seul augmente l'expression de FasL (20). L'AICD permet de contrôler le nombre de lymphocytes activés en éliminant le surplus de cellules ayant proliféré suite à l'infection. Le rôle essentiel de la voie Fas-FasL est bien illustré chez les souris *lpr* et *gld* qui sont respectivement déficientes en Fas et FasL. Ces souris possèdent une quantité anormalement élevée de lymphocytes qui s'accumulent dans la rate et les ganglions ce qui est dû à l'absence de délétion périphérique (21).

#### Clivage protéolytique de FasL

FasL peut se retrouver sous deux formes : membranaire (mFasL) ou soluble (sFasL) suite à un clivage protéolytique par des métalloprotéases (MMP) (22, 23). La composition des surnageants de cellules relarguant du sFasL démontre qu'il est présent sous forme monomérique, dimérique et trimérique, et seule la forme trimérique possède une activité apoptotique (7). L'utilisation d'un inhibiteur général des MMP peut bloquer le clivage de FasL, mais l'identité précise de la protéase impliquée demeure incertaine (24). Le micro-séquençage de la partie amino-terminale de sFasL révèle qu'il y aurait potentiellement au moins deux sites de clivage (24, 25) et il a été démontré que la MMP-

7/matrysiline (26) peut cliver FasL à une troisième position (27, 28). Selon la position de clivage, sFasL sera libéré sous forme monomérique ou multimérique et par conséquent sera pro-apoptotique ou non (24).

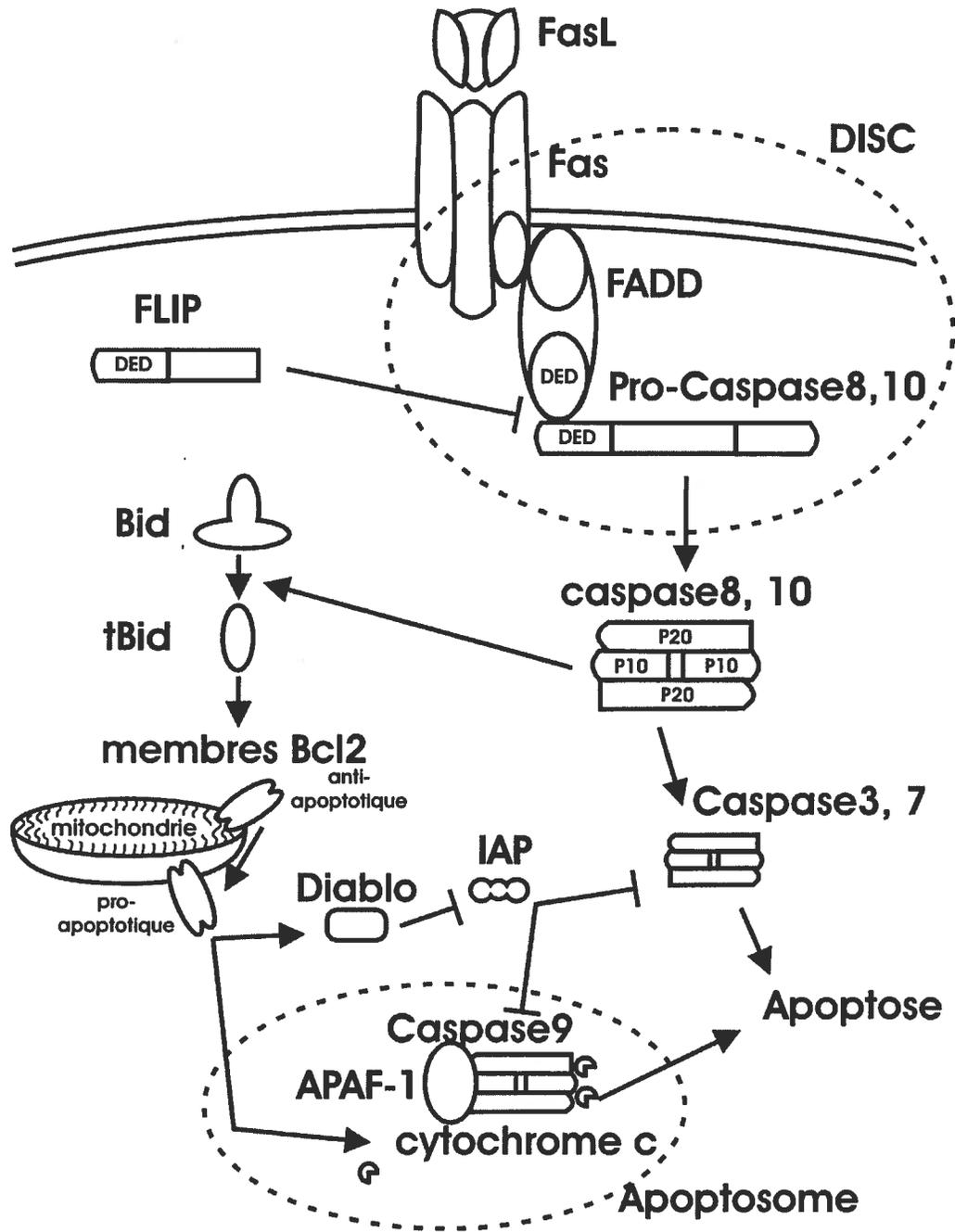
### Le récepteur Fas

Le récepteur de FasL, Fas, a été découvert par l'utilisation d'un anticorps monoclonal qui induisait l'apoptose des cellules FS-7, une lignée humaine de fibroblastes diploïdes, et est donc devenu le Fs7-Associated Surface antigen – ou FAS antigen (29); nommé aussi apoptosis-mediating antigen (APO-1), TNFRSF6 ou CD95. Fas est un récepteur membranaire de type I possédant 3 domaines Ig extracellulaires et un domaine de mort présent dans sa queue cytoplasmique. Fas est exprimé en surface sous forme de monomères et les trimères de FasL induisent sa trimérisation. Ce récepteur est exprimé constitutivement par la plupart des cellules et son niveau peut être augmenté suite à une stimulation. La partie extracellulaire de la protéine peut aussi être produite sous forme soluble par épissage alternatif et ainsi entrer en compétition avec la forme membranaire (30). L'oligomérisation de Fas est nécessaire pour transmettre le signal apoptotique puisque l'engagement de cette protéine par des anticorps divalents n'est pas suffisante pour induire l'apoptose alors que des anticorps multivalents (IgE ou IgM) le peuvent (16).

### **Mécanisme d'apoptose induite via Fas**

L'apoptose initiée via Fas suite à sa multimérisation par FasL ou un anticorps multimérique agoniste mène au recrutement de la protéine adaptatrice FADD par interactions homotypiques entre les DD présents sur les 2 protéines. Le recrutement subséquent de la pro-caspase 8 ou de la pro-caspase 10 par interactions homotypiques entre les domaines DED présents sur les caspases et FADD forme le death inducing signalling complex (DISC) (16) où peuvent se retrouver d'autres protéines comme FLICE inhibitory protein (FLIP) qui entre en compétition avec la pro-caspase-8 et inhibe l'apoptose (31). L'auto-activation de

la caspase-8 par protéolyse croisée (6) mène à la formation de l'enzyme active qui va ensuite cliver et activer les caspases exécutrices. Celles-ci vont ensuite cliver des protéines essentielles à la survie de la cellule et plusieurs facteurs anti-apoptotiques, complétant ainsi la cascade apoptotique (Figure 2) (32). Selon le type cellulaire, la voie apoptotique va différer : dans les cellules de type I, par exemple les thymocytes et les fibroblastes, la formation du DISC se fait efficacement et la caspase-8 active est suffisante pour activer la voie apoptotique via la caspase-3, alors que dans les cellules de type II, par exemple les hépatocytes, la formation du DISC est peu efficace ce qui ne suffit pas pour induire l'apoptose; le clivage de Bid est alors requis pour mener à la formation de l'apoptosome, un complexe protéique capable d'activer les caspases exécutrices, afin que la cascade apoptotique puisse être complétée (33). Le clivage de Bid par la caspase-8 permet à Bid d'agir sur la mitochondrie pour induire la libération de facteurs pro-apoptotiques comme DIABLO et le cytochrome c. Une fois dans le cytosol, le cytochrome c se joint à APAF-1 et à la caspase-9 pour former l'apoptosome. La voie apoptotique passant par la mitochondrie comprend plusieurs étapes supplémentaires où des protéines anti-apoptotiques (voir ci-dessous) peuvent intervenir pour empêcher la mort cellulaire, et donc les cellules de types II ont potentiellement plusieurs alternatives, tels divers stimuli anti-apoptotiques comme l'activation et la prolifération, pour échapper à l'apoptose induite par une stimulation des récepteurs de mort.



**Figure 2. Cascade apoptotique induite via Fas.**

Représentation schématique et abrégée des événements majeurs se produisant lors de l'engagement de Fas par FasL.

## Régulation de l'apoptose induite via Fas

La voie de signalisation apoptotique par Fas progresse par l'amplification du signal à chacune des étapes et plusieurs rétro-contrôles sont présents à divers niveaux de la cascade pour éviter une apoptose non souhaitable. À la membrane, la protéine FLIP se lie à Fas par l'entremise de FADD et est en compétition avec la caspase-8 pour le site de liaison (34). L'utilisation de faibles concentrations de cycloheximide (un inhibiteur de synthèse protéique) peut sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par Fas en réduisant les niveaux de FLIP dont la demi-vie est très courte (35). Au niveau de la mitochondrie plusieurs membres de la famille B-cell leukemia oncogene-2 (Bcl-2) forment des homodimères ou des hétérodimères et contrôlent la libération de protéines mitochondriales. Il existe des membres pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bik, Bad et Bcl-X<sub>S</sub> ou anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Mcl-1 et Bfl-1 (36). Au niveau du cytosol, les caspases actives peuvent être inhibées par des protéines connues sous le nom de inhibitor of apoptosis proteins (IAP) qui comprennent huit membres. Les IAP interagissent avec les caspases 3, 7 et 9, mais pas avec les caspases 6, 8 et 10, et bloquent leur activité. L'activité des IAP est due aux domaines BIR qu'elles contiennent : XIAP, c-IAP1 et c-IAP2 possèdent 3 domaines BIR qui leur permettent d'inhiber trois caspases (3, 7 et 9), alors que les cinq autres IAP possèdent un seul domaine BIR et n'inhibent qu'une ou deux caspases (37). Lors de l'apoptose, la libération de DIABLO par la mitochondrie va lever l'inhibition des IAP en s'associant à eux (38). Les caspases actives peuvent cependant cliver plusieurs protéines anti-apoptotiques pour les rendre pro-apoptotiques, par exemple le clivage de Bcl-2 par la caspase-3 convertit celle-ci en une protéine ayant une action similaire à Bax (39).

## Rôle des caspases

La famille des caspases comprend 14 membres, dont tous se retrouvent chez l'humain à l'exception des caspases 11 et 12 seulement présentes chez la souris et la caspase 13, présente chez les bovins (Figure 3). Toutes les caspases sont des protéases à cystéine possédant une spécificité pour les substrats ayant un acide aspartique en position P1. Les caspases sont produites sous forme de zymogènes homodimériques inactifs et sont activées protéolytiquement par clivage au niveau d'acides aspartiques (37). L'exception à cette règle est la caspase-9 qui peut agir sous sa forme zymogène (40).

Lorsqu'elles sont activées, les homodimères de caspases perdent leur pro-domaine N-terminal et l'enzyme est formé de la petite (p10) et la grande (p20) sous-unité qui restent associées pour former un hétérotétramère (41). Les caspases sont divisées en trois catégories: initiatrices, exécutrices et inflammatoires. Parmi les caspases initiatrices on retrouve les caspases 2, 8, 9 et 10 et les caspases exécutrices incluent les caspases 3, 6 et 7. Les caspases inflammatoires (1, 4, 5, 11, 12, 13 et 14) jouent un rôle apoptotique mineur et participent principalement à la conversion vers la forme active de cytokines pro-inflammatoires (37). Les caspases 1 et 5 peuvent se lier aux protéines Pycard et NALP1 pour former l'inflammasome, un complexe protéique permettant l'activation des zymogènes de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 (42).

Les caspases initiatrices 8 et 10 possèdent un domaine DED qui leur permet d'être recrutées à la membrane par interaction homotypique avec d'autres protéines possédant un DED, tel FADD, et s'activent par protéolyse croisée (37). Une fois activées, ces deux enzymes peuvent agir sur les caspases 3, 4, 6, 7, 8, 9 et 10 pour les activer. La caspase 2 est particulière puisqu'elle se retrouve au Golgi et au noyau et peut être auto-activée pour agir sur les membres de la famille Bcl-2 à la mitochondrie (43). La caspase 9 participe à la formation de l'apoptosome où elle s'unit à APAF-1 et au cytochrome c pour être activée et agir sur les caspases 3, 7 et 9. Les caspases 3 et 7 peuvent aussi

activer la caspase 9 ainsi qu'éliminer ses sites d'interaction et d'inhibition par les IAP. Lorsque les caspases pro-exécutrices sont activées, celles-ci agiront sur diverses protéines essentielles à la survie de la cellule, comme des protéines impliquées dans le maintien du cytosquelette et de la structure nucléaire et le maintien de l'intégrité de l'ADN (44). Outre l'inactivation de protéines, le clivage par les caspases peut modifier les fonctions de certaines protéines afin de promouvoir l'apoptose (32).

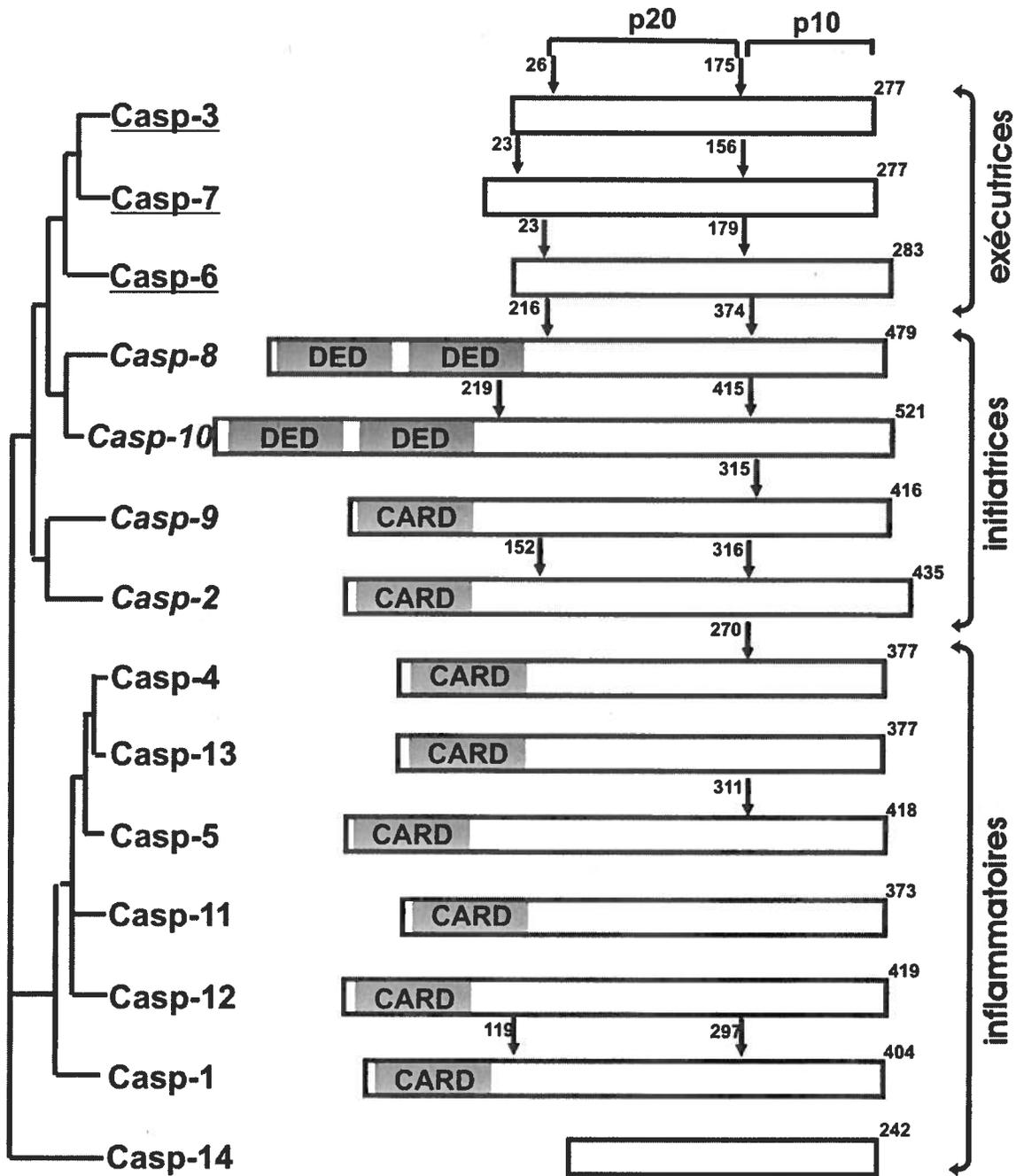


Figure 3. Membres de la famille des caspases.

Représentation schématique des caspases (taille en acide aminé). Les domaines DED et CARD sont illustrés, ainsi que les sites de clivage (flèche) des zymogènes. (tiré de Shi, Y. Mol Cell 2002 (37), avec la permission de Elsevier).

Outre les cellules T activées, FasL est aussi exprimé à la surface de cellules de sites immuno-privilégiés où il peut induire l'apoptose des cellules T auto-réactives infiltrant ces sites (45). Les sites immuno-privilégiés comme les yeux, les testicules et le placenta sont des organes protégés du système immunitaire car un dommage à ceux-ci serait fatal à la survie de l'espèce. Outre l'expression de FasL, ces organes possèdent d'autres caractéristiques pour maintenir l'état d'immuno-privilège, comme l'expression du TGF- $\beta$  qui est immunosuppresseur, la présence d'une barrière endothéliale étanche isolant le site de la circulation sanguine, un drainage lymphatique réduit, l'expression réduite de CMH-I et CMH-II et la présence de cellules présentatrices d'antigènes (APC) ayant une activité réduite (46). Plus important que les barrières passives, l'apoptose induite par l'expression de FasL induit une tolérance aux antigènes s'y trouvant (19, 47). Par exemple, une infection oculaire par HSV-1 induit une tolérance au virus en quatre jours démontrant que l'œil, en tant que site immuno-privilégié, élimine par apoptose les cellules T antivirales s'y infiltrant (47).

### **FasL et évasion tumorale**

L'expression de FasL par des cellules cancéreuses a été suggérée comme participant au phénomène d'évasion tumorale (48, 49). En effet, l'expression de FasL a été observée dans plusieurs types de cancer tels les carcinomes du colon, les mélanomes, les carcinomes hépatocellulaires et les astrocytomes (48). Une corrélation entre la présence de FasL dans les mélanomes et la survie accrue de la tumeur a été rapportée et, chez des souris Fas déficientes (*lpr*), la croissance des mélanomes était fortement réduite (50). Une corrélation a été faite entre le niveau d'expression de FasL et la sévérité des carcinomes pancréatiques (51). Une étude à grande échelle a démontré la présence de FasL sur plus de 60 % des tumeurs du sarcome de Ewing et 95 % des tumeurs FasL positives étaient métastatiques (52). L'évaluation de l'expression de FasL chez une trentaine de carcinomes gastriques suggère aussi

un lien entre l'expression et le pouvoir métastatique (53). D'autre part, sur 7 carcinomes hépatocellulaires, les trois qui exprimaient FasL étaient capables d'induire l'apoptose de lymphocytes T (54).

### **Principe de l'immuno-privilège artificiel**

Étant donné la sensibilité élevée des cellules T à l'apoptose induite par FasL, l'hypothèse a été émise que l'expression forcée de FasL à la surface d'allogreffes créerait un site immuno-privilégié artificiel qui permettrait l'acceptation d'organes non-apparentés sans l'usage d'immunosupresseurs (45). Il a d'ailleurs été démontré que l'injection de moelle osseuse allogénique chez des souris nouveau-nées immuno-compétentes pouvait induire la tolérance envers le donneur (55). Cette tolérance était due à l'expression de FasL par les cellules de la moelle osseuse puisqu'aucune tolérisation ne peut être observée avec de la moelle provenant de souris Fas déficientes (*gld*) (56).

### **Succès de l'immuno-privilège artificiel**

Il a été démontré que la greffe d'un mélange de cellules de Sertoli et de cellules de pancréas peut être acceptée sans l'usage d'immunosupresseurs (57) et il a été reconnu par après que les cellules de Sertoli des testicules expriment FasL. Alors que la greffe de cellules de Sertoli de souris de type sauvage sous la capsule rénale permet une acceptation indéfinie, les cellules de Sertoli de souris *gld* sont rejetées (58). La co-transplantation de myoblastes exprimant FasL et d'islots pancréatiques a aussi permis d'obtenir des greffes acceptées indéfiniment (59).

Le transfert adénoviral de FasL dans des cellules rénales permet la survie prolongée des cellules greffées chez les souris (60). Il a été rapporté que l'injection sous-cutanée d'acide rétinoïque augmentait l'expression de FasL par les fibroblastes locaux et dans un modèle murin de greffe de peau, l'utilisation d'acide rétinoïque permet de prolonger la survie de greffes provenant de souris de type sauvage mais pas de souris *gld* (61). L'utilisation d'APC modifiées pour

exprimer FasL et qui présentent un antigène spécifique a permis d'induire la tolérance périphérique à cet antigène (62). Cette approche a été confirmée *in vitro* en utilisant des APC dérivés de splénocytes (63, 64) et *in vivo* en utilisant des APC dérivés de la moelle osseuse dans un modèle d'allogreffe cardiaque (65) ou avec des APC provenant d'une lignée cellulaire murine dans un modèle d'inflammation (66).

### Échecs de l'immuno-privilège artificiel

Malgré ces succès, d'autres tentatives d'induction d'immuno-privilège se sont avérées infructueuses. Alors que l'expression de FasL a prolongé la survie d'allogreffes dans plusieurs modèles, de nombreuses études ont démontré un rejet aigu des greffes suite à une infiltration massive de granulocytes (67). Alors que la première étude de co-transplantation de cellules FasL<sup>+</sup> et de cellules allogéniques avait été couronnée de succès (59), une tentative pour reproduire ces résultats s'est conclue par un rejet aigu causé par une infiltration de neutrophiles (68). De même, alors que l'efficacité de transfert adénoviral de FasL pouvait induire la tolérance (60), des transferts de cellules de Langerhans ont entraîné un rejet rapide de la greffe (69, 70). De plus, plusieurs lignées cellulaires (NIH-3T3-fibroblaste murin, L5178-lymphome murin, COS-7-épithélium de singe, P815-mastocytome murin, BTC20-insulinome murin) exprimant FasL et implantées sous la capsule rénale ou sous-cutanée se sont soldées par un rejet aigu avec une infiltration de neutrophiles (71). Finalement, l'expression de FasL par des cellules musculaires cardiaques ne retarde pas le rejet de greffes de cœur chez la souris, et au contraire accélère le rejet suite à l'infiltration de neutrophiles (72).

Il a aussi été démontré en recherche clinique que l'expression de FasL par des cellules cancéreuses pouvait mener à la destruction rapide des tumeurs suite à l'infiltration massive de neutrophiles (73, 74). Aussi, l'expression forcée de FasL par des cellules cancéreuses implantées de manière sous-cutanée chez des souris n'induit pas la survie de la greffe (75). Des expériences avec souris athymique *NUDE* (*NU gene deficient*) et *NOD/SCID* (Non obese diabetic –

severe combined immunodeficiency) ont par ailleurs confirmé que les lymphocytes T et B n'étaient pas requis pour le rejet et qu'il était probablement causé par les neutrophiles (69, 76). Une expérience utilisant des souris *NUDE* et une lyse par le complément de sous-populations spécifiques de leucocytes a démontré que les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules NK n'avaient pas d'importance dans le rejet et seul l'élimination des neutrophiles réduisait le rejet (74). Il est cependant possible que d'autres types cellulaires mineurs puissent être impliqués : les cellules T  $\gamma/\delta$  qui sont thymo-indépendantes, les cellules dendritiques, et certaines sous-populations de cellules ayant résisté à la lyse par le complément (77).

L'acceptation ou le rejet de greffes exprimant FasL pourrait dépendre de facteurs micro-environnementaux comme le niveau d'expression de FasL, la présence locale de certaines cytokines, de certains types cellulaires (78) et de l'état d'activation des cellules cibles (79). Mais *in vivo*, il semblerait que ni le niveau d'expression de FasL ni le moment où son expression est induite n'influencent l'acceptation de la greffe (76). Il a cependant été démontré que le niveau d'expression de FasL par des tumeurs *in vivo* peut influencer leur survie car un faible niveau de FasL est suffisant pour recruter les neutrophiles sans les inactiver, alors qu'à forte expression les neutrophiles recrutés à la tumeur sont inactivés rendant ainsi la tumeur plus agressive (80). De même, une étude a démontré que de faibles niveaux de FasL ne protégeaient pas les cellules thyroïdiennes d'une attaque auto-immune initiée par une infiltration de lymphocytes et de neutrophiles. Par contre, lorsque de forts niveaux de FasL sont présents, l'infiltration de lymphocytes était réduite, menant ainsi à un état de tolérance (81). Cette corrélation avec l'expression de FasL a été démontrée dans un modèle de greffe thyroïdienne où l'expression transgénique de forts niveaux de FasL augmente la survie des greffes (82).

### Mode d'action indirect de FasL

Outre le niveau d'expression de FasL, la présence de certains types cellulaires pourrait influencer le rejet des greffes. Il a été démontré que lors de l'apoptose induite par FasL chez des splénocytes, une sécrétion locale d'IL-10 pouvait agir sur les APC et ainsi dévier la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2 qui favorisait la tolérance (83). Par ailleurs, *in vitro* l'engagement de Fas induit une sécrétion importante d'IL-10 par les monocytes (84). Avec des tests *in vitro* (85-87) et *in vivo* (87), il a été suggéré que sFasL pouvait recruter directement les neutrophiles, une hypothèse contestée par d'autres auteurs, autant *in vitro* (88, 89) qu'*in vivo* (90, 91). Un article publié en 1998 démontra dans un système *in vitro* le recrutement direct de cellules polymorphonucléaires (PMN) d'origine murine ou humaine. En plus d'utiliser un gradient de sFasL, ces auteurs ont induit la chimioattraction de PMN avec des anticorps dirigé contre Fas, autant IgG qui induit la dimérisation de Fas mais pas la cascade apoptotique; qu'IgM, qui induit la multimérisation de Fas et induit l'apoptose. Des cellules promyélocytopiques HL-60 différenciées par diméthyl sulfoxyde (DMSO) en PMN, ou en monocytes avec du phorbol- 12-myristate 13-acétate (PMA) ou non différenciée, étaient toutes recrutées par un gradient de sFasL. Finalement, alors que les PMN de souris *lpr* ne migraient pas vers sFasL, les PMN de souris *lpr-cg*, dont seul le domaine de mort intracellulaire est non fonctionnel, pouvaient migrer (85). Un second article a confirmé l'activité chimiotactique de FasL en utilisant un anticorps neutralisant dirigé contre Fas pour inhiber la migration des neutrophiles. Contrairement à l'agent chimiotactique classique fMLP, l'activation des PMN par FasL n'induit pas leur dégranulation ni des flux calciques; ce qui en fait un chimioattractant atypique (86). La transfection des cellules tumorales humaines avec le gène de p53 mène à la surexpression de FasL et la greffe de ces cellules chez des souris NUDE induit une infiltration massive de granulocytes et le rejet. *In vitro*, le surnageant de culture des cellules tumorales surexprimaient p53 induisant le recrutement des neutrophiles et ceci pouvait être inhibé par l'ajout d'anti-FasL (87).

À l'encontre de ces publications, des expériences *in vivo* ont démontré que FasL stimule la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les cellules de la cavité péritonéale et induit une infiltration de granulocytes. Les mêmes résultats sont observés avec des souris déficientes en caspase-1, mais pas chez celles déficientes pour l'IL-1 $\beta$ , démontrant ainsi que ce phénomène est caspase-1 indépendant (91). Les macrophages péritonéaux répondent à FasL en initiant l'apoptose et en augmentant leur production d'IL-1 $\beta$ , de macrophage inflammatory protein (MIP) - 2, -1 $\alpha$  et -1 $\beta$  (90). Dans un modèle *in vivo* utilisant une forme de FasL membranaire non-clivable, l'infiltration de granulocytes a été tout de même observée et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par des cellules de la cavité péritonéale a été mise en cause (92, 93).

*In vitro*, il a été démontré qu'un anticorps IgM dirigé contre Fas ne pouvait pas induire la chimiotaxie des neutrophiles, et que pour induire un recrutement la présence de monocytes ou de macrophages était requise et que ceux-ci sécrètent de l'IL-8 et du TNF- $\alpha$  après avoir été stimulé par Fas. La signalisation de Fas est différente entre les monocytes et les macrophages puisqu'elle est caspase dépendante et pro-apoptotique dans le premier cas, et caspase indépendante et non-apoptotique dans le second (89). Le pouvoir de chimiotaxie d'autres récepteurs de mort comme TRAIL a été testé, mais même si les neutrophiles sont sensibles à l'apoptose induite par TRAIL, celui-ci ne stimule pas de chimiotaxie (94).

### **Signalisation non-apoptotique induite par FasL**

Il est maintenant reconnu que l'engagement de Fas peut mener à une signalisation non-apoptotique (95). Outre la voie des caspases initiée par le recrutement de FADD, la phosphorylation sur tyrosine de la queue cytoplasmique de Fas a été impliquée dans l'activation de plusieurs voies de signalisation tels les MAPK (96). Il a aussi été démontré que des fibroblastes cultivés en milieu sans sérum sécrètent de l'IL-6 et de l'IL-8 suite à une stimulation par FasL par une voie impliquant nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) et

extracellular signal-regulated kinase (ERK) (97). La stimulation de cellules d'une lignée épithéliale du colon par FasL ou le TNF- $\alpha$  mène aussi à la sécrétion d'IL-8 (98). Chez des cellules humaines de gliomes, l'engagement de Fas stimule les voies ERK et p38 ce qui mène à la sécrétion de monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, d'IL-8 (99) et d'IL-6 (100). Le même profil de sécrétion peut être observé chez les cellules musculaires lisses du système vasculaire de rats (101) et ceci dépend de l'action autocrine/paracrine d'IL-1 $\alpha$  qui est sécrétée de manière caspase-dépendante (102). Des auteurs ont rapporté la sécrétion d'IL-10 (84) et d'IL-18 par les monocytes et macrophages activés par FasL et celle-ci peut-être (103) ou non (104) dépendante de la caspase-1. L'inhibition de l'activité des caspases dans des cellules T traitées avec FasL bloque leur apoptose et permet de démasquer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires impliquant les voies ERK et NF- $\kappa$ B (105). L'action de FasL sur les cellules dendritiques immatures induit leur maturation et la sécrétion de plusieurs cytokines telles l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . Les cellules dendritiques matures sécrètent aussi de l'IL-1 $\beta$  et de l'IFN- $\gamma$  suite à la liaison de Fas (106).

L'activité des caspases a été impliquée dans l'activation des cellules T (107) et le clivage sélectif de substrats de caspases a pu être observé chez des cellules T activées en absence d'apoptose (108). De plus, l'expression d'un dominant négatif de FADD diminue significativement les réponses suite à une stimulation par le TCR (109). Finalement, des mutations présentes dans la caspase-8 chez des humains ont permis de démontrer que cette protéine joue un rôle dans l'apoptose et dans l'activation des lymphocytes (110). Il apparaît donc que les voies de signalisation via Fas peuvent être non-apoptotiques et être impliquées dans l'inflammation et l'activation. Le phénomène n'est pas propre à FasL puisqu'il a été démontré avec d'autres membres de la famille TNF, que le TNF- $\alpha$  (111) et TRAIL induisent la sécrétion d'IL-8 par les astrocytes (112). Les réponses pro-inflammatoires impliquent souvent la sécrétion de chimiokines servant à recruter diverses sous-populations de leucocytes afin d'augmenter les réponses immunitaires.

## Les molécules chimiotactiques

L'une des conséquences la plus souvent observée suite à la signalisation non-apoptotique via Fas est la sécrétion de molécules chimiotactiques, en particulier celle des chimiokines. Les molécules chimiotactiques permettent de recruter spécifiquement certaines cellules du système immunitaire aux sites inflammés. Les 2 principaux groupes d'agents chimiotactiques sécrétés sont les chimiokines et les eicosanoïdes.

Les eicosanoïdes sont des molécules lipidiques dérivées suite à l'action de la phospholipase A<sub>2</sub> sur l'acide arachidonique (AA), un phospholipide membranaire. Ensuite, la voie de la lipooxygénase transforme l'AA en leucotriènes (LT), alors que la voie de la cyclooxygénase le transforme en prostaglandines (PG). Les LT, spécialement LT-B<sub>4</sub>, sont des agents chimiotactiques très puissants envers les leucocytes, particulièrement envers les neutrophiles et les éosinophiles (113). Les PG quant à elles sont des chemoattractants moins puissants, mais certaines comme PG-D<sub>2</sub> recrutent les lymphocytes à de faibles doses (114). Les récepteurs des eicosanoïdes sont tous de la famille des G protein coupled receptor (GPCR) et la signalisation intracellulaire passe par l'activation de la phospholipase C (PLC) qui mène au relâchement des réserves intracellulaires de calcium et à l'activation de la cellule.

Le deuxième groupe de molécules chimiotactiques sont des protéines nommées chimiokines. Il comporte 4 sous-groupes divisés selon la position de leur motif cystéine (C) : les CC, CXC, C et CX<sub>3</sub>C (Tableau 1). Le groupe des CC comprend 28 membres dont MCP-1 (CCL2), MIP-1 $\alpha$  (CCL3) et MIP-1 $\beta$  (CCL4) et regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES, CCL5). Le groupe des CXC comprend 16 membres divisés en 2 sous-groupes selon la présence ou non d'un motif glutamate-leucine-arginine (ELR). Les 8 chimiokines ELR<sup>+</sup> dont l'IL-8 (CXCL8) ont la caractéristique d'attirer les neutrophiles. Finalement, 2 membres forment le groupe des C (lymphotactine et single C motif (SCM)-1 $\beta$ ) et un seul membre est connu pour les CX<sub>3</sub>C, soit fractalkine. Les récepteurs des chimiokines sont aussi des GPCR. (115).

Tableau 1. Liste des Chimiokines exprimées chez l'humain

\* na = non applicable

Classe	Nom	Nom commun	ELR	Inflammatoire	Récepteur	Recrutement
CC	<b>CCL1</b>	I309	na*	+	CCR8	T, B
	<b>CCL2</b>	MCP-1	na	+	CCR2,4	NK, macro, T, B
	<b>CCL3</b>	MIP-1 $\alpha$	na	+	CCR1,4,5	NK, PMN, Macro, T
	<b>CCL4</b>	MIP-1 $\beta$	na	+	CCR5	NK, PMN, Macro, T
	<b>CCL5</b>	RANTES	na	+	CCR1,3,4,5	NK, PMN, Macro, T
	<b>CCL7</b>	MCP-3	na	+	CCR1,2,3	NK, PMN, Macro, T
	<b>CCL8</b>	MCP-2	na	+	CCR1,2,3,5	NK, PMN, Macro, T
	<b>CCL11</b>	eotaxin	na	+	CCR3,5	T
	<b>CCL12</b>	MCP-5	na	+	CCR2	T
	<b>CCL13</b>	MCP-4	na	+	CCR1,2,3,5	NK, PMN, Macro, T
	<b>CCL14</b>	HCC-1,3	na	+	CCR1,3	T
	<b>CCL15</b>	MIP-1 $\delta$ , Ikn-1	na	+	CCR1,3	PMN, Macro, T
	<b>CCL16</b>	LEC	na	+	CCR8	Macro, T, B
	<b>CCL17</b>	TARC	na	-	CCR4	T
	<b>CCL18</b>	MIP-4, PARC	na	-		
	<b>CCL19</b>	ELC, MIP-3 $\beta$	na	-	CCR7,11	NK, Macro, T
	<b>CCL20</b>	MIP-3 $\alpha$ , LARC	na	-	CCR6	NK, T, B
	<b>CCL21</b>	SLC, 6Ckine	na	-	CCR7,11	T
	<b>CCL22</b>	MDC	na	-	CCR4	NK, T, B
	<b>CCL23</b>	MIP-3	na	+	CCR1	PMN, Macro, T
	<b>CCL24</b>	eotaxin-2	na	+	CCR3	T
	<b>CCL25</b>	TECK	na	-	CCR3,9,11	Macro, T
	<b>CCL26</b>	IMAC, TSC-1	na	+		T
	<b>CCL27</b>	ALP, CTAK	na	-	CCR10	T
	<b>CCL28</b>	MEC, CCK1	na	-	CCR10	T

**Tableau 1 (suite)**

Classe	Nom	Nom commun	ELR	Inflammatoire	Récepteur	Recrutement
CXC	<b>CXCL1</b>	GROa	+	+	CXCR2	NK, PMN, Macro, T
	<b>CXCL2</b>	GROb	+	+	CXCR2	NK, PMN, Macro, T
	<b>CXCL3</b>	GROg	+	+	CXCR2	NK, PMN, Macro, T
	<b>CXCL4</b>	PF4	-	+		
	<b>CXCL5</b>	ENA-78	+	+	CXCR1,2	NK, PMN, Macro
	<b>CXCL6</b>	GCP-2	+	+	CXCR1,2	NK, PMN, Macro
	<b>CXCL7</b>	NAP-2	+	+	CXCR2	NK, PMN, Macro
	<b>CXCL8</b>	IL-8	+	+	CXCR1,2	NK, PMN, Macro
	<b>CXCL9</b>	MIG	-	+	CXCR3	NK, T
	<b>CXCL10</b>	IP-10	-	+	CXCR3	T
	<b>CXCL11</b>	I-TAC	-	+	CXCR3	NK, T
	<b>CXCL12</b>	SDF-1 $\alpha$	-	-	CXCR4	NK, Macro, T, B
	<b>CXCL13</b>	BLC	-	-	CXCR5	T, B
	<b>CXCL14</b>	BRAK	-	+		T
	<b>CXCL15</b>	lungkine	+	-		T
	<b>CXCL16</b>	SR-Psox	-	-	CXCR6	T
C	<b>XCL1</b>	Lymphotactin	na	+	XCR1	NK, T
	<b>XCL2</b>	SCM-1b	na	+	XCR1	NK, T
CXXXC	<b>CXXXCL1</b>	Fractalkine	na	+	CXXXCR1	NK, Macro, T

## Les neutrophiles

Les études *in vitro* et *in vivo* sur le pouvoir chimiotactique de sFasL ont démontré que les neutrophiles jouaient un rôle prépondérant dans le rejet de greffes ou de tumeurs. Les neutrophiles sont des leucocytes d'environ 15  $\mu\text{m}$  à l'aspect granulocytaire et ayant un noyau polylobé. Ils jouent un rôle important dans l'inflammation et la réponse immunitaire innée puisqu'ils sont les premières cellules immunitaires de la circulation sanguine arrivant aux sites d'inflammation où ils détruisent et phagocytent les micro-organismes, et peuvent recruter d'autres types de globules blancs. Chaque jour, environ  $10^{11}$  neutrophiles sont produits par la moelle osseuse d'un adulte en santé et ils ont une durée de vie moyenne de 12 h (116).

L'infiltration et l'attraction des neutrophiles aux sites inflammatoires a lieu via des chimiokines comme l'IL-8, des LT et le composé du complément C-5a (117). En plus d'induire leur migration, les chimioattractants activent les neutrophiles par un processus nommé "priming" qui augmente le niveau de récepteurs de surface (d'adhésion et de chimiokines) et provoque un réarrangement du cytosquelette menant à l'apparition de pseudopodes et à l'allongement de la cellule. Les neutrophiles ainsi activés vont rouler sur l'endothélium vasculaire, adhérer à la paroi et transmigrer par diapédèse hors de la circulation sanguine pour pénétrer dans le tissu inflammé. Lors de la migration (118) et lors de la phagocytose (119), le neutrophile peut sécréter de l'IL-8 et des LT pour amplifier les signaux de recrutement.

Pour migrer jusqu'au site d'inflammation et éliminer les pathogènes, le neutrophile peut libérer 4 types de granules, de primaire à quaternaire. Les granules primaires, aussi appelés granules azurophiles, sont les premiers à apparaître lors de la différenciation et contiennent la myéloperoxydase (MPO), des hydrolases acides, des lysosymes, des sérine protéases et des antibiotiques comme les défensines et la bactericidal with permeability increasing (BPI). Les granules secondaires, ou spécifiques, apparaissent après les primaires lors de la maturation des neutrophiles et renferment des lactoferrines, collagénases et

gélatinases. Les granules tertiaires contiennent principalement des gélatinases et les granules quaternaires, aussi nommés sécrétoires ou endocytiques, possèdent de l'albumine et des récepteurs de complément C-1 et C-3 (CR-1 et CR-3). Lors de l'activation des neutrophiles, la dégranulation se fait des quaternaires vers les primaires, ce qui permet à la cellule d'augmenter son adhésion, puis de progresser au travers de la matrice tissulaire pour attaquer les microbes avant de les phagocyter. Ces granules sont très importants pour la résolution de l'inflammation puisque leur absence dans les cas de désordres génétiques mène à une inflammation chronique (ex. : Syndrome Chédiak-Higashi, une déficience de la MPO) (120).

La phagocytose d'agents infectieux peut être stimulée par la liaison des C-1 et C-3 couvrant le pathogène aux récepteurs CR-1 et CR-3 du neutrophile. Elle peut être aussi induite par la liaison des récepteurs Fc (CD16 et CD32) qui reconnaissent la portion constante des anticorps. Suite à la phagocytose, le neutrophile va initier une flambée oxydative qui utilise la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène oxydase (NADPH-oxydase) pour former des radicaux libres dans les phagosomes et ainsi éliminer les micro-organismes qui y sont présents (121). Les neutrophiles ont une courte durée de vie et sont très sensibles à l'apoptose, et vont être éliminés lors de l'arrivée de lymphocytes de l'immunité acquise.

## **LES CELLULES NATURAL KILLER**

---

Les cellules NK constituent une composante importante du système immunitaire inné : elles possèdent une forte activité cytotoxique et sont capable de sécréter plusieurs cytokines tel l'interféron (IFN)- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et le granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (122). Les cellules NK ont longtemps été définies par leur capacité à éliminer certaines tumeurs sans stimulation préalable (123). Sans antigène permettant de les identifier, les cellules NK étaient nommées « cellules nulles non-B non-T » et il fallu attendre le milieu des années 1980 avant d'obtenir un anticorps (anti-CD56) permettant de

distinguer les cellules NK humaines d'autres types de lymphocytes (124). Ces cellules représentent de 10 à 15 % des cellules mononucléées du sang et elles se caractérisent phénotypiquement par l'expression de CD56 et CD16 et l'absence de CD3 et de CD19. La principale caractéristique de ces cellules est leur capacité à lyser certaines cellules tumorales (125). Au plan morphologique, les cellules NK sont identifiées comme étant de grands lymphocytes granulaires en raison de leur taille supérieure à celle des lymphocytes T et B et de la grande quantité de granules azurophiles présents dans leur cytoplasme. La majorité (90 %) des cellules NK humaines expriment CD56 de manière intermédiaire et sont CD16 (FcγRIII) positives, et les autres expriment CD56 de façon très élevée et sont CD16 négatives. La comparaison des fonctions des cellules NK CD16<sup>-</sup> et CD16<sup>+</sup> révèle que ces dernières possèdent une plus grande capacité cytotoxique mais prolifèrent beaucoup moins lorsque stimulées par de l'IL-2 et sécrètent moins de cytokines (125).

### **Activation cellulaire**

Les cellules NK répondent rapidement aux infections et prolifèrent suite à une stimulation par l'IL-2 ou l'IL-15 sans requérir de co-stimulation. Elles possèdent plusieurs récepteurs de monokines (cytokines sécrétées par des monocytes, cellules endothéliales et fibroblastes) telles l'IL-1, IL-10, IL-12, IL-15 et IL-18 ce qui leur permet de répondre aux signaux issus des monocytes lors de la réponse innée, parallèlement avec les neutrophiles (125). D'ailleurs certaines chimiokines CXC ELR<sup>+</sup> peuvent recruter les neutrophiles et les cellules NK puisque, chez l'humain, ces deux types cellulaires expriment les récepteurs CXCR1 et CXCR2 permettant d'être attirés par un gradient d'IL-8, de granulocyte chemotactic peptide (GCP)-2, epithelial neutrophil activating peptide (ENA)-78, neutrophil activating protein (NAP)-2 et les growth regulated oncogene (GRO)- $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . En plus, les cellules NK sont sensibles à la fractalkine puisqu'elles expriment le récepteur CX3CR1. Finalement il a été démontré qu'elles peuvent exprimer les récepteurs CXCR3 et 4 permettant de répondre à IFN inducible protein-10 (IP-10), monokine induced by IFN (MIG) et stromal cell derived factor

(SDF)-1, des chimiokines de ciblage permettant aux cellules de se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires tels les ganglions. L'activation des cellules NK humaines va induire l'expression de récepteurs de chimiokines de type CC (CCR1, 2 et 5) permettant leur migration aux sites d'infections en fonctions des gradients de chimiokines présentes dans le milieu intercellulaire. Les cellules NK activées vont sécréter diverses chimiokines spécifiques permettant la résolution de l'inflammation (XCL1, CCL1, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22 et CXCL8) par l'attraction de cellules T activées et de macrophages (115, 126). Elles vont aussi sécréter des cytokines ayant pour principal effet d'inhiber l'activité cellulaire (IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  et IL-10) et d'augmenter la prolifération des cellules du système immunitaire inné par le biais du GM-CSF (125). Il faut noter que, selon les stimuli (IL-15, IL-18 et IL-12, etc.), les cytokines produites seront différentes. Ainsi, une combinaison d'IL-12 et d'IL-18 stimule la production d'IFN- $\gamma$  alors que l'IL-12 et l'IL-15 induisent la sécrétion préférentielle d'IL-10 (127). Il a été proposé que les cellules NK puissent être subdivisées en deux groupes selon le type de cytokines qu'elles sécrètent ; tout comme les cellules Th1 versus Th2. La stimulation par l'IL-12 différencie les cellules NK en NK1 sécrétant IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  et IL-10 ce qui stimule l'activité des macrophages; alors que la présence d'IL-4 provoque la différenciation en NK2 qui sécrètent de l'IL-5 et de l'IL-13 ce qui favorise les réponses humorales de type Th2 (128).

### **Cytotoxicité**

La principale caractéristique fonctionnelle des cellules NK est leur capacité à reconnaître les variations de niveaux d'expression de CMH-I pour moduler leur cytotoxicité (129, 130). Les cellules cibles ayant des niveaux faibles d'expression de CMH-I seront sensibles à la cytolyse par les cellules NK (131). La cytolyse opère via l'exocytose de granules spécialisés suite au contact cellulaire. Il y a alors formation d'une synapse sécrétoire par polarisation des microtubules et les granules des cellules NK migrent vers le point de contact où les récepteurs d'activation ont été engagés (132). Les granules sécrétoires contiennent les granzymes A et B et de la perforine, une protéine ayant une forte

homologie avec le facteur 9 du complément (C9) qui forme des pores à la membrane cellulaire. Il fut initialement suggéré que la perforine agissait sur la cellule cible en formant des pores qui perméabilisaient la membrane cellulaire pour permettre l'entrée des granzymes, mais il a été découvert que la perforine et les granzymes sont endocytosés par les cellules cibles (133). Les granzymes A et B se lient aux mannose-6-phosphate receptor (MPR) ce qui stimule leur endocytose en compagnie de la perforine. À l'intérieur des endosomes, la perforine permet le transfert vers le cytoplasme des granzymes (134). À l'intérieur de la cellule, le granzyme B, une serine protéase ayant une spécificité similaire aux caspases, initie l'apoptose en clivant la caspase-3 et la caspase-8. La granzyme B peut aussi cliver Bid pour induire sa translocation aux membranes des mitochondries et initier l'apoptose mitochondriale par son interaction avec les autres membres pro-apoptotiques de la famille Bcl2. Granzyme A inactive des molécules impliquées dans le maintien de l'intégrité de l'ADN, forçant ainsi la cellule en apoptose de manière caspase-indépendante (135). Finalement, les granules cytotoxiques contiennent des serpinines et une forme membranaire de la cathepsine B qui inhibent l'activité de la perforine et permettent à la cellule NK de survivre à l'auto-lyse potentielle que représente ces granules (132). Outre les granules cytotoxiques, les cellules NK expriment aussi de manière inductible les molécules pro-apoptotique FasL et TRAIL qui permettent d'induire l'apoptose des cibles via les récepteurs de mort (136, 137).

### **Reconnaissance du soi**

En 1986, une équipe de chercheurs suédois découvre que la cytotoxicité des cellules NK est associée à la reconnaissance des CMH-I du soi (138), et l'hypothèse de la détection de l'absence du soi (missing self) a été émise laquelle stipule que les cellules NK servent à éliminer les cellules qui expriment de faibles niveaux de CMH-I (139). Ainsi, la baisse des niveaux de CMH-I à la surface des cellules suite à une infection virale ou lors de la transformation néoplastique mène à l'élimination de ces cellules anormales par les cellules NK. De plus, la greffe de cellules n'ayant pas le même répertoire CMH-I (par exemple

des cellules parentales) sera aussi rejetée par le manque de reconnaissance des cellules NK (140). La reconnaissance du soi opère par le biais de l'expression de récepteurs inhibiteurs qui lient spécifiquement divers CMH-I. Mais pour que les récepteurs inhibiteurs puissent agir, il faut d'abord que la cellule NK soit activée par un signal pro-cytotoxique. Il a donc été suggéré que les cellules NK doivent posséder au minimum 2 récepteurs : un d'activation et un d'inhibition (141).

### **Les récepteurs de cellules natural killer**

Il a rapidement été réalisé que les cellules NK expriment différents récepteurs caractéristiques dont certains n'ont pas encore de fonction définie, mais la plupart des natural killer receptor (NKR) (Tableau 2), comme le prédisait Yokoyama, peuvent être classés en 2 groupes: activateurs et inhibiteurs. En moyenne, chaque cellule NK exprime entre 2 et 9 NKR dont au moins un est inhibiteur (142). Pour rester concis et clair dans la présente section, je me contenterai de revoir la littérature touchant au modèle humain, sauf si spécifié.

**Tableau 2. Liste des NKR exprimés sur les cellules NK et NKT humaines**

\* = fonction d'inhibiteur (-) ou de stimulateur (+)

Nom commun	Nom CD	Partenaire membranaire	Fonction*	ligand
KIR2DL1	CD158a		-	HLA-C
KIR2DL2	CD158b1		-	HLA-C
KIR2DL3	CD158b2		-	HLA-C
KIR2DL4	CD158d	?	-/(+)	HLA-G
KIR2DL5a	CD158f		-	?
KIR2DL5b	-		-	?
KIR3DL1	CD158e1		-	HLA-Bw4
KIR3DL2	CD158k		-	HLA-A3, A11
KIR3DL3	CD158z		-	HLA-Cw3
KIR2DS1	CD158h	DAP-12	+	HLA-C
KIR2DS2	CD158j	DAP-12	+	HLA-C
KIR2DS3	-	DAP-12	+	?
KIR2DS4	CD158i	DAP-12	+	HLA-Cw4
KIR2DS5	CD158g	DAP-12	+	?
KIR2DS6	-	DAP-12	+	?
KIR3DS1	CD158e2	DAP-12	+	?
LIR1	CD85j		-	HLA-A, B, C, E, F et G
LIR2	CD85d		-	HLA-A, B, C, E, F et G

**Tableau 2. Suite**

Nom commun	Nom CD	Partenaire membranaire	fonction	ligand
NKG2A	-	CD94	-	HLA-E
NKG2B	-	CD94	-	HLA-E
NKG2C	-	CD94, DAP-12	+	HLA-E
NKG2E	-	CD94, DAP-12	+	HLA-E
NKG2H	-	CD94, DAP-12	+	HLA-E
NKG2D		DAP-10		MICA, MICB, ULBP
NKp30	-	CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$	+	?
NKp44	-	DAP-12	+	?
NKp46	-	CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$	+	HA
NKp80		NKp30, 46	+	?
2B4	CD244		+	CD48
NTBA	-		+	CD48
NCAM	CD56			CD56
HNK1	CD57			
BY55L	CD160		+	HLA-A, B, C, E, F et G
NKR-P1	CD161		+	?

### Les killer cell immunoglobulin-like receptors

Chez l'humain, la famille des killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) reconnaît des déterminants de sous-types des human leukocyte antigen (HLA)-A, B et C (CMH-I). Chez la souris, les récepteurs de la famille Ly49 sont les équivalents fonctionnels des KIR. La famille des KIR, aussi nommée CD158, est formée d'une quinzaine de membres sous-divisés entre KIR longs/inhibiteurs (L) possédant un immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) dans leur queue cytoplasmique et les courts/activateurs (S) ne possédant pas d'ITIM et qui se lient par interaction de charges dans la portion transmembranaire à la molécule adaptatrice DNAX Activation Protein (DAP)-12 qui elle comporte un immunoreceptor tyrosine-based activatory motif (ITAM) permettant l'activation (143). Les KIR sont divisés selon leur nombre de domaines Ig. Leur acronyme descriptif est par exemple KIR3DS1, ce qui signifie 1<sup>er</sup> récepteur KIR stimulateur possédant 3 domaines Ig. D'abord identifiés sur les cellules NK (144), les KIR sont aussi exprimés par des sous-populations de cellules T, particulièrement les cellules T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> et les cellules T  $\gamma\delta$  (145). Chez un individu normal, environ 4.5 % des cellules T CD8<sup>+</sup> expriment au moins un KIR et ce nombre augmente avec l'âge, atteignant jusqu'à 30 % après 60 ans (146). Il a été proposé que cette expression contribue à maintenir la tolérance aux antigènes du soi tout en sauvegardant les cellules T auto-réactives. Les cellules T exprimant des KIR requièrent une stimulation continue via le TCR pour maintenir l'expression des KIR (147). L'expression des KIR chez les cellules T ne semble cependant pas inductible et serait acquise après le réarrangement du TCR (148).

### Les leukocyte immunoglobulin-like receptors

Les leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIR), aussi appelés immunoglobulin-like transcripts (ILT) ou CD85 ont leurs gènes situés sur le même chromosome que les KIR, soit le chromosome 19, et possèdent environ le même nombre de membres. Mais de tous les membres LIR, seul LIR1/ILT2

semble pouvoir être exprimé chez les cellules NK et certaines sous-populations de cellule T, les autres membres se retrouvant sur les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et cellules B (147). Cette étude a démontré que la plupart des cellules T humaines produiraient LIR1, mais seulement une fraction serait capable d'amener cette expression à la surface de la cellule. LIR1 possède 4 domaines Ig extracellulaires et 4 domaines ITIM qui en font une molécule inhibitrice à grande spécificité pouvant lier plusieurs HLA dont les CMH-I non-classiques : HLA-E, F et G (143).

### Les récepteurs hétérodimériques CD94/NK membrane-bound protein group 2

La troisième grande famille de NKR s'apparente aux lectines de type C. La majorité des récepteurs de ce groupe sont des hétérodimères formés d'un des membres des NK-membrane-bound protein group 2 (NKG2) et de CD94. CD94 est un partenaire obligatoire et ne possède pas de queue cytoplasmique permettant la signalisation. Les NKG2 sont divisés en inhibiteurs à queue longue et contenant deux ITIM (NKG2A et B) et en activateurs à queue courte sans ITIM s'associant à DAP-12 (NKG2C, E et H) (143). Chez l'humain, le ligand des CD94/NKG2 est le CMH-I non-classique HLA-E qui présente un peptide dérivé des séquences signaux des HLA classiques et de HLA-G. Ainsi les cellules exprimant CD94/NKG2 vérifient les niveaux d'expression de HLA-A, B, C et G qui sont proportionnels à la disponibilité des peptides signaux de ces HLA (149). Le complexe CD94/NKG2A a été abondamment étudié et contrairement aux KIR, son expression peut être induite chez les cellules T suite à une stimulation via le TCR ou par des cytokines (150, 151).

### Le récepteur homodimérique NKG2D

Le récepteur NKG2D possède peu d'homologie avec les autres membres NKG2, il n'interagit pas avec CD94 et forme un homodimère NKG2D-NKG2D (152). La signalisation via ce NKR requiert le recrutement de la protéine adaptatrice DAP-10 qui possède un motif d'activation similaire à CD28. Le

recrutement de DAP-10 mène à l'activation de la phosphoinositide 3-OH kinase (PI3-kinase) et d'AKR mice thymoma protein (AKT), tout comme CD28 (153). Ceci suggère que NKG2D serait une molécule de co-stimulation similaire à CD28, particulièrement chez les cellules T où la signalisation via NKG2D opère en synergie avec celle du TCR (154) et induit la mobilisation du calcium et la prolifération (155). D'ailleurs, même si les signaux des NKR inhibiteurs dominent les signaux des NKR stimulateurs, ils ne peuvent pas bloquer le signal positif induit par la ligation de NKG2D et donc même si une cellule exprime des niveaux normaux de CMH-I, elle sera éliminée si les ligands de NKG2D sont présents (156). Par contre, l'engagement de NKG2D avec des anticorps agonistes n'est pas suffisant pour co-stimuler la réponse TCR de cellules CD8<sup>+</sup> naïves ou effectrices, mais elle modifie tout de même la stimulation CD3-CD28 (157). NKG2D est exprimé par les cellules NK, les cellules TCR  $\gamma/\delta$  et par les cellules T CD8<sup>+</sup> humaines naïves ou activées. Le traitement de cellules NK ou T avec l'IL-15 augmente l'expression de NKG2D (158). NKG2D se lie au CMH-I chain-related protein (MIC) A et B (159) et aux UL16 (protéine du cytomégalo virus) - binding proteins (ULBP) 1, 2 et 3 qui sont des molécules similaires aux CMH-I induites par le stress et fréquemment exprimées par certaines tumeurs (160). L'IL-15 libérée par les cellules épithéliales d'organes inflammés, peut aussi stimuler l'expression de NKG2D par les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) et co-stimuler ces cellules CD28 négatives lorsque les ligands MIC ou ULBP sont présents (161).

### Les natural cytotoxicity receptors

Avant la découverte des natural cytotoxicity receptors (NCR), peu de NKR activateurs étaient connus. Les 3 NCR découverts: NKp46 (162), NKp44 (163) et NKp30 (164) ne possèdent pas d'homologie entre eux et très peu avec les autres NKR (165). Ils sont impliqués dans la cytotoxicité des cellules NK et leur densité d'expression se reflète dans l'efficacité de la cytolyse (166). On peut ainsi distinguer deux types de cellules NK : les cellules NCR<sup>bas</sup> qui ont une faible capacité cytotoxique et les cellules NCR<sup>élevé</sup> qui ont une grande capacité

cytotoxique. Chez ces 2 types de cellules NK, la cytolyse est équivalente lorsqu'elles sont stimulées par CD16, démontrant ainsi que les 2 types ont le même potentiel (167). Il y a cependant des exceptions à cette corrélation de la cytolyse: par exemple, la lyse de cellules Jurkat ou HeLa est aussi efficace par les cellules NCR<sup>élevé</sup> que les cellules NCR<sup>bas</sup>, suggérant que d'autres NKR activateurs peuvent être plus importants dans certaines situations. Les NCR sont presque exclusivement exprimés sur les cellules NK et NKp44 est exprimé sélectivement sur les cellules NK activées (168). Les ligands naturels des NCR n'ont toujours pas été identifiés, mais NKp46 (169) et NKp44 (170) peuvent reconnaître les hémagglutinines de divers virus. De plus, les cellules NK activées expriment NKp30 qui reconnaît une molécule exprimée par les cellules dendritiques immatures et permet leur lyse sous certaines conditions (171).

#### CD244

La glycoprotéine CD244 (2B4), est exprimée par les cellules NK, monocytes, basophiles, cellules T  $\gamma/\delta$  et des sous-populations de lymphocytes CD8<sup>+</sup> de phénotype mémoire (172, 173). CD244 fait partie de la superfamille des récepteurs de type CD2 qui inclut notamment CD2, CD48, CD58, CD84, CDw150 et Ly-9. Tout comme CD2, le ligand de CD244 est CD48, mais CD244 possède de 6 à 9 fois plus d'affinité pour ce ligand. CD244 est un co-récepteur et, suite à l'activation des cellules NK, l'engagement de CD244 mène à la production d'IFN- $\gamma$  et à l'augmentation de la cytotoxicité (174). Il a récemment été démontré que CD244 pouvait co-stimuler la prolifération de cellules T lorsque le TCR ou le récepteur de l'IL-2 étaient co-engagés (175). CD244 mimerait ainsi la fonction de CD2 puisqu'il se lie au même ligand CD48 mais avec une plus grande affinité. Il a par ailleurs été démontré que lorsque les cellules T expriment CD244, l'interaction entre CD2 et CD48 a peu d'influence sur la prolifération des cellules T (176). CD244 augmente la cytotoxicité de cellules T activées par un antigène spécifique en se liant à son ligand CD48 présent sur les lymphocytes environnants (177).

La queue cytoplasmique de CD244 contient plusieurs motifs tyrosine pouvant être phosphorylés pour induire le recrutement de protéines adaptatrices comme signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) associated protein (SAP) ou SH2 motif containing phosphatase (SHP)-1 ainsi que linker for activation of T cells (LAT) qui est constitutivement associé à CD244 (178). Ces adaptateurs permettent le recrutement de la PLC- $\gamma$  et de growth factor receptor bound protein (Grb)-2 (179). Lorsque SAP est recruté, ceci prévient le recrutement de SHP-1 et mène à l'activation de la cellule, alors que lorsque SHP-1 est recruté, il dé-phosphoryle les protéines associées à CD244 ce qui envoie un signal inhibiteur (180). Ceci a été démontré avec des cellules NK de patients atteints de la maladie lymphoproliférative liée au chromosome X chez lesquels SAP est absent et ne peut pas compétitionner avec SHP-1 sur CD244. L'engagement de CD244 par CD48 génère des signaux inhibiteurs et bloque la cytotoxicité des cellules NK (180). Il a été récemment démontré *in vivo* que CD244 est requis pour l'activation optimale des cellules NK et T CD8<sup>+</sup> via des interactions homotypiques entre les cellules voisines, par contre il inhibe l'activité NK lorsqu'engagé par CD48 exprimé sur les cellules cibles (181).

### CD56 et CD57

CD56 est un isoforme du neural cell adhesion molecule (NCAM). Il fut le premier antigène utilisé pour distinguer les cellules NK des autres types de lymphocytes (124), ce qui a permis d'isoler 2 populations de cellules NK, soit les CD56<sup>bas</sup> et CD56<sup>élevé</sup>. Il a été découvert qu'une sous-population de cellules T exprime aussi CD56, mais l'expression de CD56 par les cellules T n'est pas constitutive et la proportion de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> varie avec l'âge (182). Une forte corrélation entre la cytotoxicité des cellules T CD8<sup>+</sup> et l'expression de CD56 a été démontrée (183). Même si la fonction exacte de cette protéine chez les lymphocytes T et les cellules NK n'est pas connue, elle pourrait être impliquée dans des interactions homotypiques et hétérotypiques entre les CTL et les cellules NK avec les cellules cibles (184). Par ailleurs il a été démontré que les

adhésions homotypiques entre cellules tumorales CD56<sup>+</sup> et cellules NK favorise la lyse des cellules néoplasiques (182, 185).

CD57 est une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion intercellulaire ainsi qu'avec la matrice extracellulaire. Cette protéine est exprimée par les cellules NK et une sous-population de cellules T dont l'abondance augmente avec l'âge (186). L'expression de CD57 par les cellules T a été liée à un état de sénescence répliquative chez des cellules ayant une faible capacité proliférative et des télomères courts (187).

### Les natural killer receptor protein-1

La famille (NKR-P1) fut l'une des premières identifiées parmi les NKR (188). Chez la souris, 5 membres sont connus : NKR-P1A, C et F qui sont des récepteurs d'activation alors que NKR-P1B et D sont inhibiteurs. NKR-P1C est le membre le plus étudié chez la souris. Il est aussi nommé NK1.1 et, chez les souches qui l'expriment, il est présent à la surface de presque toutes les cellules NK. Chez la souris, le rat et l'humain, CD161 (NKR-P1A) est un récepteur activateur. Le CD161 humain est exprimé par un sous-groupe de cellules NK, par certains monocytes et macrophages et par environ 25 % des cellules T CD4 ou CD8 mémoires (189). Le récepteur humain ne possède pas de motif ITIM cytoplasmique et ne recrute pas DAP-10 ou 12. La neutralisation de CD161 par anticorps suggère un rôle activateur pour ce récepteur sur les cellules NK (189, 190), monocytes et macrophages (191) et cellules T CD4<sup>+</sup> (192). Le ligand spécifique de CD161 n'a pas encore été identifié, mais une étude a démontré que CD161 peut lier des hydrates de carbones (193).

## AUTRES CELLULES EXPRIMANT DES RÉCEPTEURS DE CELLULES NATURAL KILLER, LES CELLULES TCR POSITIVES NKT

---

Au début des années 80 des recherches ont suggéré l'existence de cellules NKT, des cellules T exprimant des marqueurs NK (194, 195), mais il fallu attendre une dizaine d'années avant d'identifier clairement ces cellules comme étant NKR<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup> et formant une petite sous-population de lymphocytes présente dans la circulation sanguine (196-198). Les premières études sur les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> nécessitaient l'utilisation de leucaphérèses et la sélection subséquente des cellules par fluorescence activated cell sorter (FACS) pour obtenir suffisamment de cellules (199). Le terme « natural killer T cell (NKT) » est employé en 1995 dans un article décrivant des cellules murines possédant un TCR invariant et exprimant le marqueur NK1.1 (200). L'usage de ce terme devint ambigu puisqu'il a été utilisé pour nommer toutes les cellules exprimant au moins un NKR et le TCR.

Certains NKR, comme NKG2A (201) ou NKG2D (159) sont exprimés à des niveaux plus ou moins forts par toutes les cellules T CD8<sup>+</sup> et ne peuvent pas être utilisés pour identifier les NKT (Tableau 3). L'expression de CD56 est utilisée pour distinguer les cellules NK des autres lymphocytes et donc son expression par les cellules T est considérée comme un marqueur adéquat des cellules NKT. L'existence de cellules NKT a été démontrée chez l'homme, la souris et plusieurs autres espèces comme le crapaud (*xenopus*) qui ont divergé de *l'homo sapiens* il y a environ 365 millions d'années (202), démontrant que la présence des NKT dans la circulation sanguine est phylogénétiquement conservée (203). Pour les NKT le terme « killer » devient contradictoire puisque ce ne sont pas toutes les cellules NKT qui possèdent le potentiel cytotoxique des cellules NK. En effet, il est possible de diviser les cellules NKT en 2 groupes : les types I et II qui sont restreintes par CD1d, ont une activité immunorégulatrice et sont généralement sans activité cytotoxique, et les NKT-like qui sont non restreintes par CD1d et dont l'activité cytotoxique pourrait dépendre de l'expression de NKR particuliers.

**Tableau 3. Pourcentage de cellules T humaines exprimant un NKR**

Récepteur	Pourcentage de cellules T	Inductible par	Références
CD94/NKG2	4-12	IL-2, IL-15	(204-206)
NKG2A	3-10	IL-2, IL-15, TGF- $\beta$ 1	(150, 151, 207)
NKG2A, C, E ou H	4-12	?	(207, 208)
CD56	2-7	IL-2, IL-15	(183, 209)
CD57	7-15	IL-15, TCR	(183, 210)
CD160	9-11	?	(211, 212)
CD161	15-25	IL-2, IL-12, IL-15	(190, 213, 214)
CD244	5-30 (100)	?	(181, 215)
KIR	5-10	-	(147, 148, 216)
LIR	10-30 (100)	?	(143, 216)
NKp30, 44 ou 46	0	-	(163, 167, 168)
NKG2D	5-20 (100)	IL-15	(217, 218)

*Lorsque (100) est indiqué, cela signifie que certaines études rapportent la présence de ce récepteur sur toutes les cellules T CD8<sup>+</sup> à de faibles niveaux.*

### **Les cellules NKT restreintes par CD1d**

#### Historique

En 1987 est démontrée l'existence d'une sous-population de lymphocytes T doubles négatifs (DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)) exprimant des niveaux de TCR intermédiaires (TCR<sup>int</sup>) d'environ 3 fois inférieurs par rapport aux autres lymphocytes T et ayant une prédominance de 2 à 3 fois supérieure pour le gène V $\beta$ 8 (219). Ces cellules T DN peuvent produire de grandes quantités de cytokines immunomodulatrices tels l'IL-4, l'IFN- $\gamma$  et le TNF (220). Des études

ayant caractérisé la sous-population de cellules T exprimant V $\beta$ 8, ont démontré que les cellules NK1.1<sup>+</sup>, DN ou CD4<sup>+</sup> avaient la capacité de sécréter de grandes quantités de lymphokines (197, 221). Collectivement, ces études démontrent l'existence d'une sous-population mineure de lymphocytes T co-exprimant NK1.1, un TCR<sup>int</sup>, biaisé vers V $\beta$ 8 et étant soit DN ou CD4<sup>+</sup>. Le développement des cellules NKT est indépendant du CMH-II malgré le fait qu'elle puissent être CD4<sup>+</sup>, mais dépend de l'expression de la  $\beta_2$ -microglobuline ( $\beta_2$ -m) associée aux CMH-I (222). Il a été découvert que ces cellules étaient restreintes par CD1d, une molécule similaire aux CMH-I classiques (223). Les cellules murines utilisent une chaîne  $\alpha$  invariante du TCR: V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 (aussi nommée V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18) (224), alors que chez l'humain le TCR est fortement biaisé vers V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11 (225). La molécule CD1d est exprimée par les cellules dendritiques, macrophages, thymocytes et des cellules de l'épithélium intestinal, et peut présenter des antigènes hydrophobes ou des lipides (226), dont un antigène dérivé de l'éponge marine, le (2S, 3S, 4R) -1-O- ( $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- N-hexacosanoyl- 2-amino-1,3,4- octadecanetriol, communément nommé  $\alpha$ -galactosylcéramide ( $\alpha$ -GalCer). L' $\alpha$ -GalCer peut stimuler les cellules NKT via leur TCR lorsque présenté dans le contexte de CD1d (227). Ce qui distingue les cellules NKT des lymphocytes T normaux est leur sélection positive par des thymocytes double positifs (DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)) exprimant CD1d et la  $\beta_2$ -m ou par des cellules dendritiques, plutôt que par les cellules épithéliales du cortex du thymus (228, 229).

#### Caractéristiques des cellules NKT restreintes par CD1d

Les cellules NKT restreintes par CD1d se développent dans le thymus et sont sélectionnées positivement par interactions avec des thymocytes DP. Il n'est pas clair si les NKT sont issues de précurseurs uniques et distincts (modèle stochastique) (230) ou si elles proviennent de thymocytes communs qui suite au réarrangement du TCR acquièrent les caractéristiques uniques des NKT (modèle instructif) (231). Le modèle instructif est présentement favorisé (232) puisque plusieurs équipes ont démontré que les NKT sont initialement des thymocytes

DP qui interagissent avec CD1d pour être sélectionnés positivement. Par la suite, ces cellules vont devenir matures et acquérir des NKR en périphérie (233, 234). Chez la souris, les cellules NKT se retrouvent surtout dans le foie et dans la moelle osseuse où elles représentent respectivement 30 à 50 % et 20 à 30 % des lymphocytes T. Par contre, elles sont peu abondantes dans le sang et les ganglions où elles représentent seulement 3 % et 0.3 % , respectivement (235).

On peut sous-diviser les NKT classiques selon plusieurs caractéristiques.

- Alors que la plupart des NKT restreintes par CD1d expriment un TCR canonique ( $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ ,  $V\beta 8$ ) (NKT de type I), d'autres expriment un TCR biaisé ( $V\alpha 3$  et  $V\alpha 8$  avec  $V\beta 8$ ) mais tout de même variable (NKT de type II) (236). Il a été démontré que chez les souris  $TCR\alpha 281$  déficientes, le nombre de NKT  $CD4^+$  diminuait dramatiquement, alors que le nombre des DN et  $CD8^+$  n'était pas réduit (237).

- Il est possible de distinguer les NKT classiques en cellules  $NKR^+$  et  $NKR^-$ . Il semblerait que les NKT  $NKR^-$  sécrètent plus d'IL-4 que les NKT  $NKR^+$  et la production d'IFN- $\gamma$  est en corrélation avec le niveau d'expression des NKR (238).

- Chez la souris, les cellules NKT restreintes par CD1d  $NKR^+$  sont soit DN ou  $CD4^+$ , probablement à cause de la sélection négative intrathymique des  $CD8^+$  (224). Chez l'humain dans de rares cas, jusqu'à 50 % des cellules NKT restreintes par CD1d peuvent exprimer l'homodimère  $CD8\alpha\alpha$  (239). Selon leur phénotype, les cellules NKT classiques ont été divisées en 2 groupes :  $CD4^-$  et  $CD4^+$ . Les NKT  $CD4^+$  produisent plus d'IL-4, IL-13, GM-CSF et IL-2 et les 2 groupes sécrètent des niveaux semblables de TNF et IFN- $\gamma$  (239, 240).

Puisque les cellules NKT sécrètent des cytokines de type Th1 et Th2, leur rôle *in vivo* reste incertain. L'une des principales fonctions attribuées aux NKT est la modulation du système immunitaire et la défense anti-tumorale. Plusieurs études ont démontré l'effet protecteur des NKT stimulées par  $\alpha$ -GalCer envers

diverses tumeurs et métastases (241). Cette action pourrait être directe via la cytolyse (242) ou indirecte par la stimulation de cellules NK (243). Une autre fonction proposée serait l'immunosuppression pour protéger contre l'auto-immunité. Ce rôle a été démontré chez les souris NOD, un modèle murin du diabète, dans lesquelles le nombre de NKT est réduit (244) : le transfert adoptif de ces cellules (245, 246) ou la stimulation des souris NOD avec l' $\alpha$ -GalCer (247, 248) peut empêcher la progression de la maladie. Un déficit de cellules NKT chez des patients diabétiques a été observé (249). D'autres observations suggèrent que les cellules NKT pourraient protéger de l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE), un modèle murin de la sclérose en plaque (250). Finalement, les NKT peuvent répondre à certains glycolipides bactériens et sécréter de l'IFN- $\gamma$  pour initier de l'inflammation locale (251-253).

### **Les cellules NKT non restreintes par CD1d.**

En plus des NKT classiques, il existe des NKT non-classiques que l'on appelle NKT-like, c'est à dire des NKT exprimant des TCR diversifiés non-restreints par CD1d et au moins un NKR. La plupart de ces NKT-like ont le phénotype de cellules mémoires (CD45RO<sup>+</sup> (humain) ou CD44<sup>élevé</sup> (souris), Fas<sup>+</sup>, CD122<sup>+</sup>) et expriment CD8 ou sont DN. La diversité au sein de ce groupe suggère que ces cellules ne sont pas une lignée distincte comme les NKT classiques, mais plutôt que la stimulation répétée mène à l'induction de l'expression de certains NKR par des cellules T CD8<sup>+</sup> (254). Au contraire des cellules NK, les cellules NKT-like ne semblent pas nécessairement exprimer au moins un NKR inhibiteur, ce qui suggère que le rôle des NKR sur ces cellules pourrait être différent de celui chez les cellules NK (204). Plusieurs groupes de cellules NKT-like ont été identifiés et ceux-ci seront brièvement revus.

### Les cellules T mémoires de type 1

Pour les NKT CD8<sup>+</sup> exprimant un NKR inhibiteur (de type KIR, LIR ou CD94/NKG2), Eric Vivier suggère l'appellation T Cell Memory type 1 (Tm1) (255). Il semble que tout comme les cellules T mémoires, les Tm1 s'accumulent avec l'âge et une étude de diversité des CDR3 des TCR démontre que ces cellules sont oligoclonales ce qui suggère que les Tm1 s'accumulent suite à une stimulation répétée par un antigène spécifique (146). Une telle expansion peut être observée dans les cas d'infections chroniques ou de maladies auto-immunitaires. D'ailleurs des sous-populations de cellules B (B-1) stimulées par des antigènes du soi de manière continue peuvent aussi exprimer des NKR (256). Par ailleurs, il a été démontré que la stimulation répétée de cellules T menait à l'acquisition d'une résistance à l'apoptose par la voie de Fas et donc à une résistance à l'AICD. Chez ces cellules, l'expression des caspases 3, 8 et 10 est diminuée et la formation du DISC devient inefficace (257). De plus, les cellules T mémoires expriment de forts niveaux de survivine (258) et de Bcl-2 (259), ce qui augmente leur résistance à l'apoptose. Lorsque stimulées, les cellules Tm1 expriment des facteurs anti-apoptotiques pour résister à l'apoptose (146). L'engagement de KIR2DL1 (inhibiteur) chez les cellules Tm1 inhibe partiellement l'apoptose via l'induction de FLIP qui inhibe l'activation de la caspase 8 (260). Plusieurs NKR (CD56, CD161 et CD244) sont exprimés par les cellules Tm1 ou sont induits suite à une stimulation. Par contre, d'autres NKR ne semblent pas être induits (KIR) et la présence de certains n'a pas pu être détectée à la surface de cellules T (NKp30, 44, et 46) (256).

### Les NKT-like intra-hépatiques

Le foie est un organe lymphoïde important dont la population de lymphocytes est unique, comprenant ceux de la circulation sanguine en transit, mais aussi des lymphocytes résidents. Les cellules résidentes sont en majorité des cellules T CD8<sup>+</sup> parmi lesquelles on retrouve une population importante de cellules TCR<sup>int</sup>, incluant des NKT classiques. Il a été suggéré que le foie pourrait

être un site particulier de rétention et d'élimination des cellules T activées apoptotiques; c'est l'hypothèse du cimetière. Une autre hypothèse, celle de l'abattoir, suggère que l'apoptose des cellules T activées serait initiée au foie induisant une tolérance locale par délétion clonale (261). Parmi les lymphocytes intra-hépatiques, on retrouve environ 35 % de cellules NK et 25 % de cellules CD8<sup>+</sup> NKR<sup>+</sup>, nommées Natural T cells (NT). Cette population est virtuellement absente dans les autres organes et ne représente que 2 % des cellules de la circulation périphérique (262). Ces NT ont un phénotype de cellules T activées et environ 30 % expriment le TCR  $\gamma/\delta$  chez la souris adulte. Les NT TCR  $\gamma/\delta$  sont détectées chez des souris athymiques et forment une population majeure chez les souriceaux (263). Outre une occurrence marquée au niveau du foie, les cellules NT constituent une fraction significative des IEL (213). Ces cellules produisent de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$ , de l'IL-2 et autres cytokines Th1 et possèdent une cytotoxicité similaire aux cellules NK (262).

#### Les cellules cytokine induced killer

Au début des années 1980, des auteurs ont rapporté que la culture *ex vivo* de PBMC permettait d'obtenir des cellules nommées lymphokine activated killer (LAK) ayant une forte activité cytotoxique anti-tumorale (264). C'est en tentant d'identifier la population de lymphocytes responsables de l'apparition des LAK que des cellules NKT-like ont été mises en évidence : leur phénotype de cellules T matures a été identifié, les cellules ont été isolées et leur activité cytotoxique après culture *ex vivo* a été démontrée (265). Puisque les LAK sont dérivées des cellules NK (266), la population de cellules NKT-like ayant proliféré *ex vivo* ont été nommées Cytokine Induced Killer (CIK) (267).

Les CIK apparaissent *ex vivo* suite à la prolifération et différenciation des PBMC avec de l'IFN- $\gamma$ , de l'anti-CD3 et une dose intermédiaire d'IL-2; après 1 mois de culture, une population de lymphocytes comprenant 20-40 % de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> apparaît. Ces cellules sont majoritairement TCR  $\alpha/\beta$  et CD8 positives (268). Les CIK sont très résistantes à l'apoptose grâce à leur forte

expression de FLIP, Bcl-2, Bcl-xL et survivine (269). Les CIK peuvent aussi apparaître en utilisant de l'IL-2 en combinaison avec de l'IL-12 et de l'anti-CD3 (270). Les CIK proviennent de la différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup> ou DN et acquièrent des NKR et une forte capacité cytotoxique (271). Les CIK ont un pouvoir cytolytique de cellules tumorales supérieur aux LAK et sont considérées pour l'immunothérapie du cancer par transfert adoptif (272). D'ailleurs ces cellules ont démontré leur efficacité pour éliminer plusieurs types de tumeurs en modèles murins (267, 271, 273, 274). Un cas clinique d'une acute myeloid leukemia (AML) accompagné d'une prolifération de large granular lymphocytes (LGL) polyclonaux a été rapportée et ces LGL avaient le phénotype CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, exprimaient le NKR CD244 et étaient très efficaces pour éliminer les cellules leucémiques autologues (275).

### Les cellules T mémoires

Lors d'une infection, la majorité des cellules T antigène-spécifiques vont être éliminées par AICD et les 5 à 10 % des cellules restantes deviennent des cellules T mémoires (T<sub>mem</sub>) ayant une longue vie. La sélection des cellules survivantes se fait par des mécanismes largement inconnus, mais il a été démontré que l'expression élevée du récepteur de l'IL-7 (IL-7R) et de Bcl-X<sub>L</sub> était en corrélation avec la survie accrue des cellules (276). Les cellules T mémoires sont divisées en 5 sous-groupes phénotypiques selon leur stade de différenciation, basé sur l'expression de marqueurs tels CD28, CD27, CCR5 et CCR7. Ainsi, les cellules naïves, CD45RA<sup>+</sup>, deviennent des cellules mémoires (CD45RA<sup>-</sup>) CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CCR5<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup>, puis CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> (mémoires centrales), puis CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> ou CD45RO<sup>+</sup> (mémoires effectrices), puis CD27<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> et finalement CD27<sup>-</sup> CD28<sup>-</sup> (277). Les cellules T<sub>m1</sub> sont majoritairement CCR7<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> et feraient donc partie des populations de cellules T mémoires post-effectrices (146).

## CARACTÉRISATION DES CELLULES T MÉMOIRES NKR POSITIVES

### Phénotype des cellules T mémoires NKR positives

Chez l'humain, la différenciation *in vivo* de cellules T CD8<sup>+</sup> en cellules effectrices-mémoires est en corrélation avec l'acquisition de CD244 (215). Une corrélation existe entre l'expression des NKR CD161, CD56, CD158a et le phénotype mémoire CD45RO<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CD8β<sup>bas</sup>, et ces cellules expriment Fas, la perforine et le granzyme A (278). Des études de réarrangement du TCR et d'expression spécifique de KIR par des cellules NKT-like suggèrent que les KIR sont acquis après le réarrangement du TCR (148).

Il a été démontré chez la souris que la stimulation de cellules T avec de l'IL-2 ou de l'IL-15 menait à l'acquisition de NK1.1 par ces cellules, dont plus de 50 % étaient CD8<sup>+</sup>. Toutes les cellules CD8<sup>+</sup> ayant acquis NK1.1 étaient IL-2Rβ<sup>+</sup> et une portion des cellules de cette sous-population exprimaient aussi Ly49A, Ly49C et/ou Ly49G2, des NKR murins inhibiteurs (279). La stimulation par l'IL-2 de lymphocytes murins CD44<sup>élevé</sup>CD8<sup>+</sup> induit aussi l'acquisition de NKR et augmente leur cytotoxicité envers des cellules tumorales sensibles à l'activité NK (217, 280). L'IL-15 est une cytokine stimulant la prolifération des cellules NK et des cellules T naïves et activées. Lorsque des cellules T naïves sont stimulées par IL-15 *in vitro*, il y a baisse d'expression de CD45RA et de CD28, acquisition de perforine et de granzyme B et ces cellules deviennent capables de sécréter du TNF-α et de l'IFN-γ (281).

Le patron de cytokines produites lors d'infections virales pourrait moduler l'expression des NKR et ainsi le phénotype des cellules NKT-like. L'expression de NKR inhibiteurs par les cellules T activées pourrait être liée à des infections spécifiques, et celles-ci pourraient ou non mener à la prolifération de cellules NKT-like (282). Par exemple, la protéine Nef du Human Immunodeficiency Virus (VIH) favorise la sécrétion d'IL-10 et d'IL-15 et ces deux cytokines induisent l'expression de NKR *in vitro* (282). Chez la souris, la sécrétion d'IFN-γ en réponse à une infection stimule la production, par les cellules dendritiques, d'IL-

15 pouvant induire l'expression de NKR (283). Par contre, des infections virales avec human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) sont associées à une baisse de la fréquence de NKT-like (284). Une étude *in vivo* a démontré que certaines infections bactériennes ou virales induisent l'expression de NKG2A/CD94 et de KLRG1 par la majorité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques pour les antigènes, mais peu exprimaient Ly49 et cette induction était indépendante de la production d'IL-15 (208). L'infection de souris par le virus influenza mène aussi à l'apparition de cellules NKR<sup>+</sup> (279) et à une augmentation du nombre de cellules CD8<sup>+</sup> NKR-P1C<sup>+</sup> avec une fraction des cellules exprimant un ou des récepteur(s) Ly49. Plus de 30 % de ces cellules exprimaient un TCR spécifiques pour les antigènes du virus et avaient la capacité de produire de l'IFN- $\gamma$  (285).

#### Rôle des cellules T mémoires NKR positives

Il a été proposé que les lymphocytes T acquièrent des récepteurs NK pour moduler la réponse par le TCR en augmentant ou en diminuant le seuil d'activation (286). Chez des souris transgéniques pour le NKR inhibiteur KIR2DL3, il a été démontré *in vivo* que l'engagement de ce récepteur causait l'accumulation sélective d'une sous-population de cellules T CD8<sup>+</sup> de type mémoire exprimant l'IL-2R $\beta$  et ayant une sensibilité à l'ACID réduite (216).

Les souris transgéniques pour l'expression de Ly49A sont plus susceptibles au développement de maladies inflammatoires auto-immunitaires (287). De plus, des clones auto-réactifs exprimant des KIR inhibiteurs ont été isolés de patients ayant des mélanomes et chez des individus en santé (288). Finalement, il a été démontré que l'expression de KIR inhibiteurs par des cellules T peut être réduite en engageant ces KIR ou augmentée en engageant le TCR. Ainsi les clones faiblement auto-réactifs ne sont pas éliminés en périphérie car la stimulation via les KIR inhibiteurs par les cellules CMH-I<sup>+</sup> inhibe l'activation des NKT-like KIR<sup>+</sup> et mène à une réduction des niveaux de KIR; cependant lorsque ces cellules reconnaissent un antigène de forte affinité, l'activation via le TCR

fournit un signal positif (147). Dans les réponses anti-tumorales, les NKT-like auto-réactives n'attaquent pas les cellules normales puisque celles-ci expriment des ligands de KIR alors que les cellules tumorales ayant une expression de CMH réduite peuvent être reconnues et éliminées (289). Chez les souris transgéniques exprimant un TCR spécifique pour le peptide immuno-dominant gp33 du lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), la présence de cet « auto-antigène » induit l'expression du NKR inhibiteur Ly49A par les lymphocytes T et cette expression réduit l'activation spécifique par le TCR des lymphocytes T auto-réactifs (290).

Il a été proposé que les cellules T puissent acquérir des NKR suite à une stimulation prolongée lors d'une infection chronique. L'expression de NKR inhibiteurs servirait à augmenter le seuil d'activation des cellules pour éviter d'induire l'anergie ou l'AICD (286). L'expression de NKR inhibiteurs pourrait donc contribuer à la survie des cellules T mémoires en réduisant leur apoptose (216).

L'expression de NKR inhibiteurs participerait à la régulation de l'activité cytolytique des NKT-like lors d'infections chroniques, comme celles par Epstein-Barr virus (EBV) (148) ou VIH (205, 291). Chez la souris, les infections avec LCMV causent l'apparition de NKT-like exprimant le NKR inhibiteur Ly49G2 qui inhiberait la réponse cytotoxique et cette inhibition pourrait être renversée en bloquant le récepteur Ly49G2 ou en augmentant les niveaux de peptides présentés (292). Chez la souris, une infection par le virus du polyome stimule l'apparition d'une population de NKT-like exprimant CD94/NKG2A. Au début de l'infection peu de cellules NKT-like sont présentes et les cellules T spécifiques pour le virus sont hautement cytotoxiques, mais lorsque la phase active d'élimination est entamée, la plupart des CTL deviennent CD94/NKG2A<sup>+</sup> et sont moins cytotoxiques envers les cellules infectées. Ceci démontre qu'un des rôles des NKR inhibiteurs chez les cellules T effectrices seraient de réduire la cytotoxicité de cellules potentiellement auto-réactives qui seraient néfastes à l'organisme lorsque l'infection est circonscrite (201). Chez les souris prédisposées au cancer suite à l'infection par le virus du polyome, il a été

démontré que les cellules T exprimant CD94/NKG2A apparaissaient beaucoup plus rapidement ce qui cause un délai dans l'élimination du virus et une augmentation du nombre de cellules cancéreuses (201, 293). Par contre, l'expression de NKR activateurs par des cellules NKT-like pourrait servir à augmenter leur cytotoxicité en diminuant le seuil d'activation du TCR requis pour lyser les cibles tumorales (286).

## Cellules T auto-réactives et extrathymiques

Certaines maladies autoimmunitaires sont précédées d'une lymphopénie qui est compensée par la prolifération homéostatique intense de cellules T pour reconstituer le bassin lymphocytaire. Il a été démontré chez les souris NOD qu'une lymphopénie suivie d'une intense prolifération génère des clones auto-réactifs initiant l'autoimmunité (294).

Alors que la plupart des cellules T CD8<sup>+</sup> expriment l'hétérodimère  $\alpha\beta$  de CD8, certaines sous-populations expriment l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ . Dans la circulation sanguine humaine, les cellules exprimant CD8 $\alpha\alpha$  se retrouvent parmi les cellules effectrices-mémoires et les cellules mémoires terminalement différenciées. Les cellules CD8 $\alpha\alpha$  possèdent beaucoup moins de signal-joint TCR rearrangement excision circles (TREC), et ces cellules sont oligoclonales par rapport à la population de cellules CD8 $\alpha\beta$ . Il a été proposé que certaines cellules CD8 $\alpha\beta$  lorsque stimulées, prolifèrent et se différencient en diminuant l'expression de CD8 $\beta$  pour devenir CD8 $\alpha\alpha$  (295). Les cellules T CD8 $\alpha\alpha$  peuvent être sélectionnées positivement dans le thymus contre des peptides du soi agonistes indépendamment de l'expression de CD8 $\beta$  et cette sélection n'impliquerait pas le CMH-I (296).

Lors de la sélection thymique, les cellules T exprimant des TCR auto-réactifs sont éliminées par sélection négative. Pourtant, dans certains modèles d'auto-immunité, les souris TCR transgéniques envers l'antigène H-Y (H-Y), OT-1 ou CMH-II 5C7, l'utilisation de fortes doses de peptide cause l'apparition de cellules auto-réactives CD8 $\alpha\alpha$ , alors qu'à de faibles doses, les cellules CD8<sup>+</sup> expriment l'hétérodimère  $\alpha\beta$ . L'analyse des gènes exprimés par ces cellules a montré qu'elles exprimaient plusieurs gènes de cellules NK, comme les NKR d'activation CD244, NKR-P1A, NK1.1 et CD94/NKG2C et E et H (297). Les cellules mémoires auto-réactives de souris TCR H-Y possèdent un seuil d'activation du TCR supérieur par rapport aux cellules naïves, mais peuvent être activées *in vitro* par différentes cytokines telles l'IL-2 ou l'IL-15. L'expression de

faibles niveaux de CD8 $\alpha\beta$  et la co-expression du récepteur NKG2D semble augmenter leur capacité de tuer des cibles sensibles et résistantes à l'activité NK (298). L'analyse des cellules T CD8 $^+$  mémoires chez la souris a démontré que des cellules thymo-dépendantes et indépendantes existent. Les cellules thymo-indépendantes possèdent un taux de division plus rapide et vivent donc moins longtemps mais prolifèrent fortement en réponse à l'IL-2 et à l'IL-15 (299). Le modèle H-Y a permis de démontrer que les cellules T qui se développaient de manière extra-thymique étaient TCR $^{\text{int}}$ , exprimaient la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IL-2, de faibles niveaux de CD8 $\alpha\beta$ , sécrètent de l'IFN- $\gamma$  mais sont NK1.1 négatives (300).

Il est bien connu que les souris NUDE possèdent des cellules NKT-like CD8 $^+$  qui auraient une importante activité cytotoxique (301). Ces cellules peuvent être détectées dans la moelle osseuse, la rate et le foie (302). Les cellules NKT-like TCR $^{\text{int}}$  se développent sélectivement dans le foie et la rate chez les souris irradiées et thymectomisées reconstituées avec de la moelle osseuse de souris syngénique (303). Les cellules NKT-like CD8 $^+$  sont enrichies en CD8 $\alpha\alpha$  et alors que le nombre de DN et CD4 $^+$  diminue dans les souris thymectomisées, le nombre de NKT-like CD8 $^+$  n'est pas affecté (237). Des études plus récentes suggèrent que chez les souris athymiques, le développement des cellules T a lieu dans les ganglions mésentériques, mais lorsque le thymus est présent, la voie de développement extra-thymique est inhibée et par conséquent les cellules CD8 $\alpha\alpha$  TCR $\alpha/\beta$  qui apparaissent sont d'origine thymique (304).

Les NKT-like se retrouvent en quantité normale chez les souris déficientes pour la  $\beta_2\text{m}$  (contrairement aux cellules NKT classiques), pour le CMH-II ou pour la  $\beta_2\text{m}$  et le CMH-II et les souris TCR H-Y indépendamment de la sélection positive ou négative thymique. Suite à une stimulation par le CD3, des NKT-like sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et très peu d'IL-4. En cultivant des PBMC avec une dose intermédiaire d'IL-2, il est possible de stimuler préférentiellement la prolifération de NKT-like, alors que l'utilisation d'une forte dose d'IL-2 stimule

l'expansion de cellules NK activées, les LAK. (305). Les cellules T auto-réactives sont caractérisées par l'expression de niveaux intermédiaires de TCR, une forte expression de FasL, et l'expression de NK1.1 par ces cellules qui est en corrélation avec une capacité de lyse autologue supérieure (306). Il a été suggéré que chez les cellules B-1, qui sont liées à l'auto-immunité, l'expression de NKR comme Ly49 serviraient à inhiber l'activation de cellules reconnaissant les CMH-I du soi (256).

## **RELATION ENTRE L'ÂGE ET L'ABONDANCE DES LYMPHOCYTES**

---

À partir de la fin de la puberté (autour de 15 ans), le thymus s'atrophie et cette involution mène à une réduction de la superficie du cortex thymique et à une baisse du nombre de cellules T émigrant du thymus. Cette réduction de nouvelles cellules est compensée par la prolifération homéostatique de clones préexistants, ce qui par contre diminue la diversité du répertoire (307). À un âge plus avancé (chez les seniors et centenaires), la baisse du nombre de cellules T est compensée par une augmentation du nombre de cellules NK et d'autres cellules du système immunitaire inné. Au niveau cellulaire plusieurs fonctions sont altérées et la cytotoxicité et la capacité de sécrétion des cellules T et NK sont diminuées (308, 309).

CD56 et CD57 sont considérés comme étant des marqueurs de cellules NK (186) et l'expression de CD57 est aussi proposée comme étant un marqueur de différenciation terminale des cellules T CD8<sup>+</sup> (187). Dans le sang de cordon ombilical, les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> sont présentes en très faibles pourcentages, mais la stimulation de PBMC de nouveau-nés avec l'IL-15 cause la prolifération de cette population (310). CD57 a aussi été utilisé pour identifier les cellules NKT-like, mais plusieurs observations démontrent que ce marqueur est propre à

une population distincte de NKT-like, même si plus de 50 % des cellules CD56<sup>+</sup> sont aussi CD57<sup>+</sup> (311). La population de CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> représente environ 5 à 10 % des lymphocytes dans la circulation et augmente avec l'âge, alors que les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> représentent environ 2 à 5 %, un taux qui reste stable avec l'âge (312, 313) ou augmente un peu (311). Les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> expriment des niveaux intermédiaires de TCR et sont capable de lyser des cibles NK-sensibles, mais seules les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> sont capables de lyser des cellules cibles résistantes aux cellules NK (311, 313). Les analyses de diversité des CDR3 des chaînes V $\beta$  suggèrent que ces deux groupes sont d'origine différente (313). Outre CD57, d'autres NKR exprimés par les cellules T démontrent aussi une corrélation positive avec l'âge (KIR et LIR (146)). Par contre, chez les cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> et d'autres NKT-like exprimant NKG2A<sup>+</sup> (146) aucune corrélation n'a pu être démontrée.

## Problématique de la recherche.

Lorsque nous avons entamé ce projet de doctorat, notre premier objectif de recherche était d'élucider la controverse entourant la fonction chimiotactique de la molécule FasL : est-ce que oui ou non il y a attraction directe de neutrophiles par FasL. Notre hypothèse de travail pour répondre à ce premier objectif fut que les neutrophiles requéraient la participation de cellules médiatrices pour être recrutés vers FasL. Nous voulions donc identifier et caractériser les cellules permettant le recrutement indirect ainsi que le mécanisme intracellulaire et les molécules sécrétées responsables de cette migration des neutrophiles.

Après avoir identifié que les cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> sont capables de recruter des cellules du système immunitaire inné suite à l'engagement de Fas, nous avons voulu caractériser fonctionnellement et phénotypiquement ces cellules. Notre hypothèse de travail pour ce deuxième objectif fut que ces cellules NKT-like étaient des cellules T mémoires exprimant des marqueurs de cellules NK. Nous voulions donc analyser le phénotype de ces cellules ainsi qu'évaluer par tests *in vitro* leur capacité proliférative et cytotoxique.

Entre temps, nous avons aussi mis à jour l'inhibition de la coloration avec certains anticorps anti-CD8 par l'EDTA. Nous avons voulu déterminer la nature de ce phénomène avec en tête l'hypothèse que cet effet était peut-être dû à un changement de conformation similaire à ce qu'on observe avec les intégrines. Nous voulions donc déterminer si le phénomène était spécifique à CD8 et à l'anticorps utilisé, s'il était dû à une internalisation du co-récepteur et s'il était dépendant de la présence de cations.

## ***2<sup>e</sup> Partie : méthodes et résultats***

*Chapitre 2 : 1<sup>er</sup> Article : CD1d-Unrestricted Human NKT Cells  
Release Chemokines upon Fas Engagement*

*Chapitre 3: 2e Article : Two Functionally Distinct Populations of  
Human Memory T cells Expressing Natural Killer Cell  
Markers Differentiated by CD3 and CD94 Expression.*

*Chapitre 4: Résultats additionnels non publiés*

**CHAPITRE 2 ARTICLE I : CD1D-UNRESTRICTED HUMAN NKT CELLS RELEASE**  
**CHEMOKINES UPON FAS ENGAGEMENT.**

**MISE EN CONTEXTE DU 1<sup>er</sup> ARTICLE**

---

Au moment où ce projet a été entamé, deux études (85, 86) avaient démontré le chimiotactisme direct de neutrophiles dans un gradient de FasL. Ceci avait un impact majeur dans l'induction de l'immunoprivilège artificiel basé sur l'utilisation de FasL en tant qu'agent pro-apoptotique. Plusieurs études *in vivo* d'immunoprivilège utilisant FasL avaient observé un rejet aigu suite à l'infiltration massive de granulocytes (67-72). Nous nous sommes donc intéressés au mécanisme de chimioattraction de neutrophiles par FasL.

Nos premières données nous suggéraient que FasL n'induisait pas directement la migration des neutrophiles, mais plutôt qu'une population de lymphocytes pouvait agir comme cellules intermédiaires et recruter les neutrophiles suite à l'engagement de Fas. Alors que nos résultats démontraient une chimioattraction rapide (moins de 2h), une équipe a montré que la stimulation de monocytes et macrophages par FasL stimulait la sécrétion de chimiokines en 18h (89).

Nos objectifs spécifiques étaient donc de:

- confirmer que la migration des neutrophiles n'était pas une conséquence directe de l'engagement de Fas sur ceux-ci.
- déterminer et caractériser la population lymphocytaire induisant la migration indirecte des neutrophiles.
- caractériser le mécanisme et identifier les molécules impliquées dans la chimioattraction indirecte.

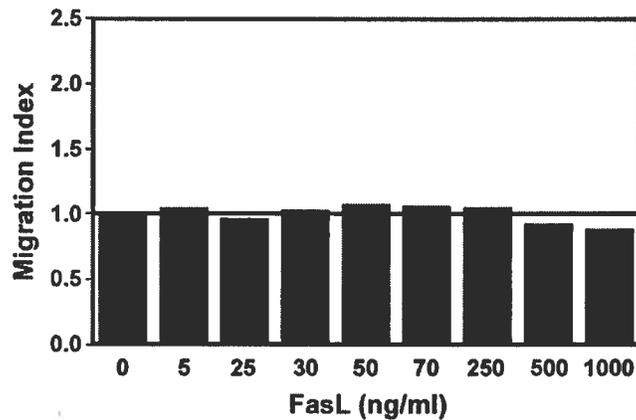
Les cellules NKT non-restreintes par CD1d sécrètent des chimiokines suite à l'engagement de Fas

Plusieurs tentatives pour induire l'immunoprivilège artificiel d'allogreffe en forçant l'expression de Fas Ligand ont démontré un rejet accéléré attribuable à une infiltration massive de neutrophiles. Alors qu'il a été proposé que FasL pourrait être directement chimiotactique envers les neutrophiles, plusieurs expériences suggèrent que le recrutement serait indirect. Des tests de migration *in vitro* utilisant des sous-populations de leucocytes purifiées permettraient de vérifier cette hypothèse. Dans ces conditions, les granulocytes ne migraient pas suite à la stimulation par FasL et requéraient la présence de cellules T exprimant plusieurs récepteurs de cellules NK. Ces cellules T COB mémoires exprimaient des marqueurs de cellules T et de cellules NK et n'étaient pas restreintes par CD1d, démontrant ainsi qu'elles forment une population distincte des cellules NKT classiques. De plus, ces cellules avaient la capacité d'éliminer des cellules cibles sensibles et insensibles à la lyse par les cellules NK. Finalement, suite à l'engagement du récepteur Fas, ces cellules sécrétaient plusieurs chimiokines de type CC et CXC qui peuvent recruter les granulocytes, les monocytes et les cellules NK. Bien que la sécrétion des facteurs chimiotactiques dépende de l'activité des caspases, ces cellules étaient réfractaires à l'apoptose. La capacité de cellules NKT-like à recruter plusieurs sous-populations de leucocytes du système immunitaire inné pourrait avoir un rôle important dans l'élimination des cellules cancéreuses et pourrait contribuer au développement des maladies inflammatoires.

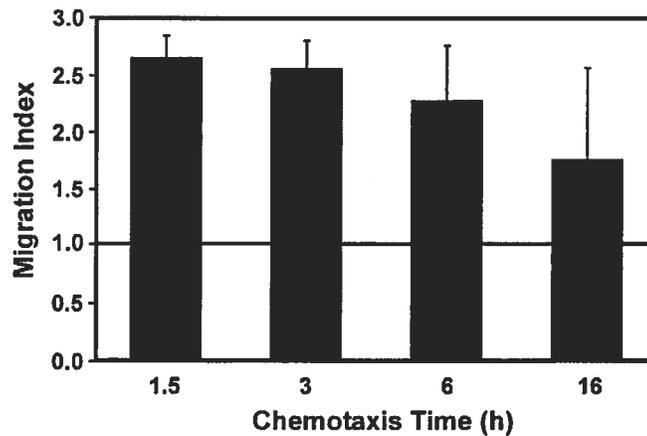
*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

Giroux M, Denis F. CD1d-unrestricted human NKT cells release chemokines upon Fas engagement. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):703-10. Epub 2004 Sep 2.  
doi:10.1182/blood-2004-04-1537

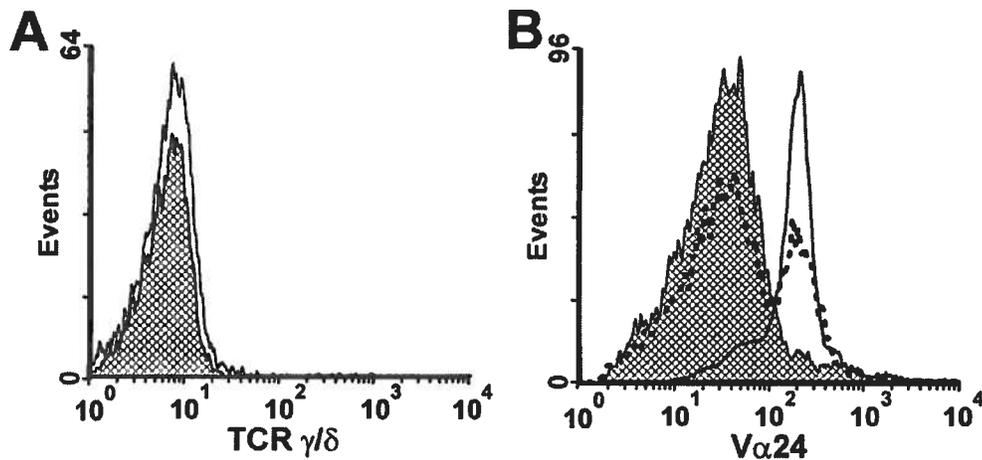
## SUPPLEMENTARY DATA NOT SHOWN



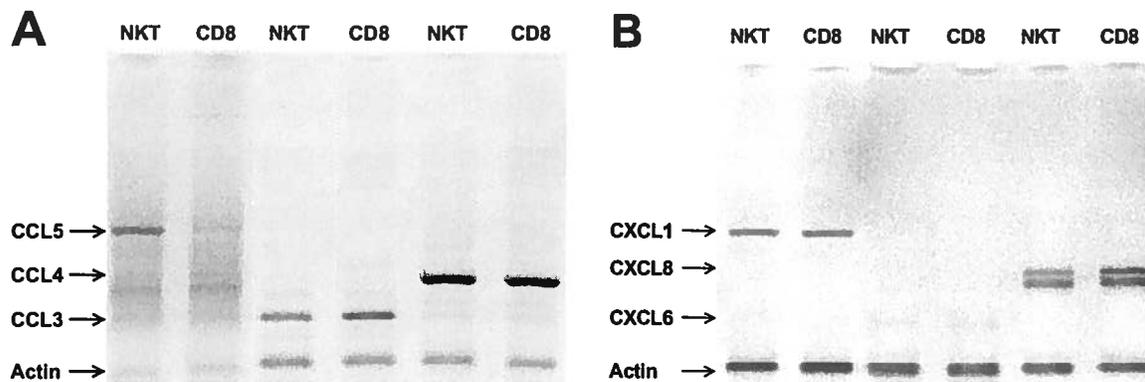
SD-F1. Neutrophils are unresponsive to various doses of cross-linked soluble FasL. Soluble FasL (Alexis) was placed in the lower wells with the enhancer antibody and migration assays were performed as described in the materials section. No migration could be observed regardless of the amount of sFasL used (spanning 3 logs).



SD-F2. Influence of incubation time on neutrophil migration. CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells were placed in the lower Boyden chamber with 30 ng/ml of cross-linked sFasL, while neutrophils were placed in the upper chamber. The Boyden chamber was incubated as described in the materials section for the indicated amount of time in the above Figure and cell migration was evaluated as described. Figure 2 clearly shows that increasing migration assay time does lead to an increase in the migration index, suggesting that NKT cell chemotactic factor release is a rapid process.



SD-F3. FACS analysis of cell-surface markers expressed by CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells. A. TCR  $\gamma/\delta$  staining; cross-hatched: isotypic control, white: CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells. B. TCR V $\alpha$ 24 staining; cross-hatched: CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells, dashed line: CD3<sup>+</sup> cells after one round of V $\alpha$ 24 MACS positive selection, white: CD3<sup>+</sup> cells after two rounds of V $\alpha$ 24 MACS positive selection. V $\alpha$ 24 cells obtained by two rounds of MACS selection were used in migration assays (Fig. 2C) and CD1d tetramer staining (Fig. 4E).



SD-F4. RT-PCR analysis of chemokine expression by CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. A. Expression of selected CC chemokines. B. Expression of selected CXC chemokines. CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (NKT) cells expressed all analysed chemokines at levels similar to CD8<sup>+</sup> T cells, with the exception of CCL5 which was expressed at higher levels by NKT cells. While only low levels of CXCL6 were expressed by either cell types, all other chemokines analysed were detected.

Total RNA was isolated from  $2 \times 10^6$  cells using the Trizol reagent (InVitrogen). cDNA was synthesized by reverse transcription on 5 ug total RNA using Superscript II (InVitrogen). PCR amplification was performed for 30 cycles using the following cycling conditions: 95°C for 30 sec, 50°C for 45 sec and 72°C for 1 min. The primers used were:

5'Actin	GAGGGAATCGTGCGTGACATCAA
3'Actin	GGAACCGCTCGTTGCCAATAGTGA
5'CXCL1	GCTCTTCCGCTCCTCTCAC
3'CXCL1	CCGCCAGCCTCTATCACAG
5'CXCL6	GCTGCTGCTCCTGCTGAC
3'CXCL6	AACTGCTCCGCTGAAGACTG
5'CXCL8	GTATTAGCCACCATCTTACCTCAC
3'CXCL8	TTCAACACAGCACTACCAACAC
5'CCL3	TTGAGACGAGCAGCCAGTG
3'CCL3	GGCAACAACCAGTCCATAGAAG
5'CCL4	CCCGAGCACAGGACACAG
3'CCL4	CTCAGTTCAGTTCAGGTCATAC
5'CCL5	CCTCGCTGTCATCCTCATTG
3'CCL5	GGTTCACGCCATTCTCCTG

**TABLE 1. Checkerboard analysis of neutrophil migration in response to supernatants obtained from FasL-treated NKT cells.**

		LOWER WELL			
		[Supernatant]	0X	1X	2X
UPPER WELL	0X		1.00 ± 0.11	1.75 ± 0.10	2.45 ± 0.16
	1X			1.21 ± 0.05	2.23 ± 0.20
	2X				1.25 ± 0.08

SD-T1. Checkerboard analysis of neutrophil migration in response to soluble factors. Supernatants from FasL-treated  $CD56^+CD3^+$  cells were obtained as described in the materials section and used at the optimal concentration (2X) or less. This analysis clearly shows that when equivalent amounts of supernatants are placed in both chambers (diagonal in Table 1), neutrophil migration is minimal, compared to when higher concentrations of supernatants are present in lower wells as compared to upper wells. This demonstrates that supernatants obtained from FasL-treated  $CD56^+CD3^+$  cells contain a factor that does not enhance chemokinesis and that a chemotactic factor is released by  $CD56^+CD3^+$  cells.

**CHAPITRE 3 ARTICLE II : TWO FUNCTIONALLY DISTINCT POPULATIONS OF HUMAN  
MEMORY T CELLS EXPRESSING NATURAL KILLER CELL MARKERS DIFFERENTIATED BY  
CD3 AND CD94 EXPRESSION.**

**MISE EN CONTEXTE DU 2<sup>e</sup> ARTICLE**

---

La littérature dispose de peu de données concernant la population de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> que nous avons identifiée comme étant responsable du chimiotactisme indirect des cellules du système immunitaire inné (article I) et la plupart des études utilisaient des modèles murins. Nous nous sommes donc intéressés à mieux comprendre le rôle et l'ontogénie de ces cellules NKT-like CD56<sup>+</sup>. Lors des premières caractérisations phénotypiques des cellules NKT-like CD56<sup>+</sup>, nous avons noté que celles-ci exprimaient deux niveaux d'intensité du récepteur CD3 : bas et élevé. Nous avons utilisé cet élément comme point de départ pour diviser les cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> en deux groupes (CD3<sup>élevé</sup>, CD3<sup>bas</sup>) et effectuer une caractérisation fonctionnelle plus poussée des sous-populations de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> dont les objectifs spécifiques étaient de :

- caractériser les capacités fonctionnelles de chacune des sous-populations.
- tenter d'identifier l'ontogénie de ces sous-populations de cellules NKT-like.

### Deux populations fonctionnellement distinctes de cellules T mémoires exprimant des marqueurs de cellules NK diffèrent sur la base de l'expression de CD3 et de CD94.

L'expression de récepteurs de cellules NK par des cellules T est de plus en plus reconnue comme ayant un rôle à jouer dans la modulation des réponses cellulaires. Nous démontrons que les cellules T mémoires CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> peuvent être divisées en 2 groupes majeurs selon leur expression de CD94 et leur niveau de CD3. Alors que les deux groupes sécrètent des chimiokines pouvant recruter les cellules du système immunitaire inné lorsque traitées avec FasL, seules les cellules CD94<sup>+</sup> étaient hautement cytotoxiques et exprimaient de forts niveaux de perforine. Ces deux groupes proliféraient lorsque stimulés par la cytokine IL-15, mais les cellules CD94<sup>-</sup> répondaient moins bien que les CD94<sup>+</sup> à la stimulation de CD3-CD28. Lorsque stimulées par l'IL-15, les cellules CD94<sup>-</sup> augmentaient significativement leur contenu en perforine alors qu'une stimulation CD3-CD28 des cellules CD94<sup>+</sup> diminuait l'expression de perforine et causait la perte d'expression de CD94 chez une grande proportion de cellules. La différenciation par IL-15 et CD3-CD28 suggère que ces deux groupes font partie d'un même type cellulaire. La perte de CD94 suite à la stimulation par CD3-CD28 ainsi que l'absence de CD94 chez les cellules T CD3<sup>bas</sup> ont été liées à une expression réduite d'ARNm des partenaires d'interactions de CD94 : NKG2A, C et E. Finalement, nous avons démontré que l'abondance de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> semble dépendre de facteurs environnementaux et diminue grandement avec l'âge. Puisque les cellules hautement cytotoxiques CD3<sup>élevé</sup>CD94<sup>+</sup> sont virtuellement non-déTECTABLES après l'âge de 40 ans, la perte de cette sous-population pourrait avoir un rôle à jouer dans l'augmentation de l'incidence des cancers ainsi que dans les maladies inflammatoires.

Cet article est soumis pour publication au Journal of Immunology.

## TITLE PAGE

**Title:** Two Functionally Distinct Populations of Human Memory T cells Expressing Natural Killer Cell Markers Differentiated by CD3 and CD94 Expression.

**Running Head:** CD94 expression distinguish NKR<sup>+</sup> memory T cells subsets

**Authors:** Martin Giroux, Véronique Allard and François Denis

**From:** INRS-Institut Armand-Frappier,  
531 Boulevard des Prairies,  
Laval (Québec), Canada, H7V 1B7

**Financial support:** Roche Organ Transplantation Research Foundation grant 472805283 and Canadian Institutes for Health Research grant MOP-55848 to FD. Ph.D. studentship to MG and M.Sc. studentship to VA from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

**Correspondence to:** François Denis  
INRS-Institut Armand-Frappier,  
531 Boulevard des Prairies,  
Laval (Québec), Canada, H7V 1B7  
Phone: 450-686-5613  
Fax: 450-686-5301  
E-mail: [francois.denis@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:francois.denis@inrs-iaf.quebec.ca)

**Abstract Word Count:** 180

**Manuscript Word Count:** 4139

**Scientific Heading:** Immunobiology

## ABSTRACT

Natural Killer cell receptor acquisition by antigen-experienced T cells is thought to modulate T cell responses. We show that CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cytotoxic memory T cells can be divided in two major subsets based on CD94 and CD3 expression levels. While both subsets are able to release chemokines upon Fas engagement, CD94<sup>+</sup> cells are more cytotoxic and express higher levels of perforin. Both subsets showed limited proliferation in response to IL-15, but CD94<sup>-</sup> cells were much less responsive to TCR engagement *in vitro*. Upon IL-15 treatment, CD94<sup>-</sup> cells significantly upregulated perforin levels, while CD3 stimulation caused CD94<sup>+</sup> cells to become perforin<sup>low</sup> and the number of CD94 positive cells was drastically reduced, suggesting that subsets are developmentally related. The absence of CD94 cell-surface expression was associated to reduced NKG2A, C and E interaction partner levels. The number of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells per donor is variable between timepoints and in the population analysed a significant decrease in their abundance in relation with age was observed. Since the highly cytotoxic CD3<sup>high</sup>CD94<sup>+</sup> cell subset became nearly undetectable by age 40, such a loss might contribute to reduced cancer immune surveillance associated with aging.

## INTRODUCTION

Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells that express Natural Killer cell receptors (NKR) represent a minor fraction of circulating T cells (1, 2). Expression of at least one NKR such as CD161 (3), CD57 (4), CD94/NKG2 heterodimers (5), NKG2D (6), CD244 (7) has been used to classify such T cells as Natural Killer T cells (NKT) cells. However, these are distinct from classical NKT cells as they are not restricted by CD1d and do not express the human invariant V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11 T cell receptor (TCR) (8). The acquired expression of NKR has been proposed to modulate T cell responses by increasing or decreasing activation thresholds (9). The expression of activating NKR might decrease TCR activation thresholds and allow tumor cell recognition and killing (10). In mice, the expression of inhibitory NKR has been associated to increased apoptotic resistance and preferential cell survival during inflammation resolution (11). T cell NKR expression has also been linked to disease in certain models of auto-immunity (12, 13), suggesting that NKR expressing T cells might be self-reactive (14, 15). Finally, chronic activation can promote NKR expression by memory T cells to reduce inappropriate activation and prevent self-specific cytotoxicity (16).

Among NKR expressed by human non-classical NKT cells, the CD56 adhesion molecule can be expressed by 2 to 5% of circulating mononuclear cells (1, 2). CD56 positive T cells are usually memory CD8<sup>+</sup> T cells that express CD122, CD161, CD244 and high levels of perforin, granzyme A and Fas (17). A correlation between CD56 expression and increased cytotoxicity has been demonstrated (18), presumably by favoring interactions between cytotoxic T lymphocytes (CTL) and their targets (19). Interestingly, CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells are able to kill both NK-sensitive and NK-insensitive targets (20), showing that they possess the cytotoxic abilities of both T and NK cells. Beside their cytotoxicity, we showed that CD1d-independent CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells have the ability to indirectly recruit neutrophils, NK cells and monocytes by releasing chemokines upon Fas engagement (21). As such, this unusual cell subset could contribute to both inflammation and cancer immune surveillance. During the course of our study, we noticed that CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells could be divided in two groups of CD3<sup>high</sup> and CD3<sup>int</sup> cells and we hypothesized that these represented two fonctionnally distinct cell subsets.

While CD56<sup>+</sup> memory T cells consistently expressed other NKR such as CD161 and CD244, they displayed bimodal CD3 expression levels that varied between donors (21). We show that

only the CD3<sup>high</sup> cell subset express CD94 and that the lack of CD94 cell-surface expression by CD3<sup>int</sup>CD56<sup>+</sup> cells is caused by reduced expression of the NKG2 interaction partners. While both CD94<sup>+</sup> and CD94<sup>-</sup> cell subsets were able to mediate indirect cell recruitment upon Fas engagement, they displayed marked differences in their proliferation and cytotoxic abilities. Furthermore, cells of the CD94<sup>+</sup> subset differentiated into CD94<sup>-</sup> cells upon TCR engagement, while IL-15 promoted perforin acquisition and CD94 expression. Both subsets showed an age-dependent decrease in abundance with an accelerated disappearance of the highly cytotoxic subset. We conclude that NKR<sup>+</sup> memory T cells can be divided by their expression of CD94 which, when present, is correlated to a high cytotoxic profile. Upon TCR stimulation *in vitro* CD94<sup>+</sup> memory T cells can differentiate into the low proliferative low cytotoxic CD94<sup>-</sup> cell subset. Inverse correlation between the abundance of CD56<sup>+</sup> memory T cell subsets and age suggests that these cells could be involved in resistance to age-related diseases such as autoimmunity and altered cancer resistance.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cells and reagents**

Raji cells (CCL-86) were from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) and were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) and penicillin-streptomycin (Invitrogen, Burlington, Canada). CD3, CD8, CD15, CD45RA and CD56 multisort microbeads were from Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Streptavidins conjugated with phycoerythrin (PE), fluorescein isothiocyanate (FITC) or PE-Cy5 were from BD-Biosciences (Mississauga, Canada). Antibodies used were CD3-PE (UCHT1) from Sigma (St-Louis, MO); CD8 $\alpha$ -FITC (RPA-T8), CD45RO-FITC (UCHL-1), CD56-Biotin (B159) from BD-Biosciences; CD3 (UCHT1), CD3-allophycocyanin (APC) (UCHT1), CD28 (CD28.2), CD94-FITC (DX22) and CD94-PE (DX22) from eBioscience (San Diego, CA); Perforin-FITC ( $\delta$ G9) from Calbiochem (La Jolla, CA). The apoptosis detection kit was from BD-Biosciences, carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) was from Molecular Probes (Eugene, OR), IL-15 was from eBioscience, IL-2, Protein G, phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin were from Sigma, saponin and polymyxin B were from Calbiochem. FLAG-tagged recombinant soluble human FasL (sFasL) and anti-FLAG enhancer antibody were from Alexis Biochemicals (Carlsbad, CA). The isotypic control for the enhancer antibody was purified mouse immunoglobulin G1 $\kappa$  (IgG1 $\kappa$ ; MOPC-21) from BD-Biosciences.

### **Cell purification and FACS analysis**

Leukocytes were isolated from heparinized peripheral blood of healthy volunteers having signed an informed consent form. The study protocol was approved by the Comité d'Éthique en Recherche (CÉR) of the Institut National de la Recherche Scientifique at Université du Québec. Peripheral blood mononuclear cells (PMBC) were purified by Ficoll-Hypaque centrifugation (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Canada). CD8<sup>+</sup> T cells were obtained from the buffy coat by magnetic cell sorting (MACS) positive selection using CD8 microbeads and neutrophils were obtained by MACS positive selection using CD15 microbeads. NKR<sup>+</sup> memory T cells and NK cells were isolated by MACS positive selection using CD56-multisort microbeads, followed by CD45RA microbead separation. For all MACS separations, Fc receptors were blocked with Fc Block (Miltenyi Biotec) and two rounds of MACS positive or negative selection were performed in all instances. The two NKR<sup>+</sup> memory T cell subsets were purified from CD56<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> cells obtained by MACS by cell sorting on a FACSVantage SE (Becton-Dickinson, Oakville, Canada)

after staining with CD94-FITC and CD3-APC antibodies. For intracellular staining, cells were fixed 20 min with 4 % paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) and permeabilized 10 min with 0.1 % saponin in 20 % FBS. Cells were stained using conditions suggested by manufacturer and analyzed on a FACSCalibur (Becton-Dickinson) flow cytometer.

### **Cytotoxicity and chemotaxis assays**

The cytotoxicity of NKR<sup>+</sup> memory T cell subsets towards NK-resistant Raji targets<sup>22</sup> was evaluated by measuring target apoptosis. CD56<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> cells were sorted with CD94 and CD3 antibodies and allowed to proliferate 5 days in RPMI-1640 supplemented with 5 ng/ml IL-2, 10 % FBS and penicillin-streptomycin. Effectors and Raji targets were incubated in RPMI-1640 for 4 h at 37°C using effector to target (E:T) ratios ranging from 5:1 to 40:1. Cells were washed twice with Annexin V binding buffer and stained with Annexin V-PE and 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) according to manufacturer's instructions. After gating targets by side and forward scatter, cells positive for Annexin V-PE and negative for 7-AAD were scored as apoptotic (22).

Migration assays were performed in triplicate in a MBA96 modified Boyden Chamber (Neuroprobe, Gaithersburg, MD) fitted with 3 µM polycarbonate filters. All reagents were endotoxin-free (<5 EU) as determined by the endpoint chromogenic Limulus Amebocyte Lysate assay (Endosafe, Wilmington, MA). FasL (30 ng/ml) with its enhancer (1 µg/ml) or control mouse IgG1κ antibody (1 µg/ml) were diluted in RPMI-1640 supplemented with 1 mg/ml Bovine Serum Albumin and 5 µg/ml polymyxin B. 10<sup>6</sup> neutrophils or NK cells per ml were placed in upper wells and 2.5x10<sup>3</sup> CD56<sup>+</sup> memory T cells were placed in the lower chamber. Determination of the number of migrated cells was performed as described previously (23). In brief, following a 90 min incubation at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, upper wells were washed with PBS and incubated 10 min with PBS supplemented with 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to detach cells. Cells having migrated in the lower wells were recovered by a 5 min centrifugation at 500 g and taken up in 350 µl of PBS. The number of migrated cells was determined by flow cytometric cell counting and a migration index was derived by dividing the number of cells in the test sample by the number of cells in the negative control.

### ***In vitro* proliferation assays**

Purified CD56<sup>+</sup> memory T cells (10<sup>5</sup>) from each subset were labeled 10 min at 37°C with 2.5 µM CFSE, washed twice with PBS and cultured in non-tissue culture-treated 96-well plates (Sarstedt, Montreal, Canada) in RPMI-1640 supplemented with 10 % FBS and penicillin-streptomycin.

Plates were pre-coated with anti-CD3 antibody by adding 100  $\mu$ l of antibody (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 or 1  $\mu$ g/ml) in 50 mM Tris.HCl (pH 9.3) for 2 h at 37°C, then washed twice with PBS. Cells were cultured in uncoated plates with 10 ng/ml IL-15, 100 nM PMA and 1  $\mu$ M ionomycin, or in plates with immobilized anti-CD3 to which 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 antibody and 1  $\mu$ g/ml Protein G were added. The culture medium was changed every 3 days and the number of proliferating cells was evaluated by measuring the decrease in CFSE signal intensity.

### **RT-PCR analysis**

The expression of NKG2 family members was evaluated by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from  $3 \times 10^5$  cells using Trizol (Invitrogen) and first strand cDNA synthesis was performed using oligodT(15) and Superscript II (Invitrogen) according to manufacturer instructions. For PCR, 4  $\mu$ l of cDNA were used in a mixture containing 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTP and 100 pmol primers (Table 1) in a final volume of 50  $\mu$ l. Cycling conditions used were 30 sec denaturation at 94°C, 30 sec annealing at 55°C and 1 min elongation at 72°C for 30 cycles or 25 cycles for  $\beta$ -actin. Twenty  $\mu$ l of PCR reactions were electrophoresed 30 min at 5 V/cm on 1% agarose Tris-Borate-EDTA gels containing 1  $\mu$ g/ml ethidium bromide. Gels were illuminated at 302 nm and images captured on an AlphaImager 3400 imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA). Signal intensity was normalized against the  $\beta$ -actin signal using AlphaEase software (Alpha Innotech).

## RESULTS

### Phenotypic characterization of NKR-expressing memory T cells

A minor population of memory lymphocytes co-expresses the CD56 NK cell marker and CD3. While these TCR $\alpha/\beta$  CD8<sup>+</sup> T cells also express CD244 and CD161 NK markers, they are distinct from classical NKT cells since they are CD1d-independent and display an activated phenotype and functional cytotoxicity. We showed that these non-classical NKT cells can kill NK-sensitive and NK-insensitive targets and release chemokines upon Fas engagement and that this subset expressed CD45RO (hereafter named CD56<sup>+</sup> memory T cell). In all individuals studied (age 20-28), CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells showed bimodal CD3 expression levels with differences in relative subset abundance between donors (21). Since it has been shown that classical NKT cells and some self-reactive T cells express about 3 times lower TCR levels compared to normal CD3<sup>+</sup> lymphocytes (24), we evaluated whether non-classical NKT cells shared this characteristic. NKR<sup>+</sup> memory NKT cells obtained by MACS positive selection with CD3 and CD56 microbeads and CD45RA depletion were compared to CD8<sup>+</sup> T cells for CD3 levels. Figure 1A shows the typical CD3 expression pattern of CD56<sup>+</sup> memory T cells which reveals that CD56<sup>+</sup>CD3<sup>int</sup> cells express levels of CD3 similar to CD8<sup>+</sup> T cells and CD3<sup>high</sup> cells express about 3-fold higher levels (n=85). Since cells expressed CD56, CD161 and CD244 NK cell markers, the presence of other NKR was evaluated, revealing that CD94, the NKG2 family interaction partner (25), was solely expressed by CD3<sup>high</sup> cells (Figure 1B).

### Functional characteristics of CD94<sup>+</sup> and CD94<sup>-</sup> memory T cell subsets

To evaluate if functional differences exist between CD3<sup>int</sup> and CD3<sup>high</sup> memory T cell subsets, CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells obtained by MACS were sorted using CD3 and CD94 antibodies. Populations were over 95% pure (typical result shown in Figure 2A) and used in indirect chemotaxis assays using neutrophils and NK cells as responding cells. Compared to total CD56<sup>+</sup> memory T cells, individual subsets were only slightly less efficient at promoting indirect cell recruitment upon FasL treatment (Figure 2B, n=3) and this ability was not confined to one subset. In contrast, cytotoxicity towards NK-resistant Raji cells was markedly different, with CD94<sup>+</sup> cells being 3 times more efficient at inducing target apoptosis than CD94<sup>-</sup> cells (Figure 2C). To understand the reasons underlying this difference, intracellular perforin levels were compared and while the majority of control CD8<sup>+</sup> T cells were perforin negative, CD94<sup>-</sup> cells

expressed low levels of perforin and CD94<sup>+</sup> cells expressed 5-fold higher perforin levels (Figure 2D, n=5). These results demonstrate that the superior cytotoxicity of CD94<sup>+</sup> cells is associated with a higher perforin content.

### **Different cell subset responsiveness to TCR stimulation**

Memory CD8<sup>+</sup> T cells are known to respond to IL-15, a cytokine involved in NK and memory T cell homeostasis (26, 27). Since CD94<sup>+</sup> cells expressed higher CD3 levels than CD94<sup>-</sup> cells, subset TCR responsiveness was compared to IL-15 responsiveness after 7 days of *in vitro* incubation (n=4). The percentage of cells that divided in response to IL-15 was similar in both subsets (Figure 3A). In contrast, about half of CD94<sup>+</sup> cells underwent at least one division in response to immobilized CD3 with CD28, while less than a third of CD94<sup>-</sup> cells divided. To evaluate if lower TCR levels in CD94<sup>-</sup> cells contributes to decreased responsiveness, a CD3 antibody dose-response curve was performed on the proliferation assay (Figure 3B, n=2). CD94<sup>+</sup> cells proliferated in a manner similar to CD8<sup>+</sup> T cells while CD94<sup>-</sup> cells responded poorly at all doses tested. Given that CD94<sup>-</sup>CD3<sup>int</sup> cells expressed similar CD3 levels compared to CD8<sup>+</sup> T cells, decreased proliferation was clearly not due to insufficient TCR levels. Furthermore, all populations responded similarly to PMA-ionomycin, showing that CD94<sup>-</sup> cells do not have inherent proliferation defects and are thus less responsive to TCR engagement.

### **NKT cell subset abundance varies with environmental exposure and aging**

Analysis of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> memory T cell abundance in 10 different donors aged under 30 years old (58 bleeds) revealed that the percentage of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells varied greatly among donors and also within same donors (Figure 4A) at different timepoints, arguing that environmental factors modulate *in vivo* the expansion and contraction of this cell population. When the abundance of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells was evaluated in donors aged between 20 and 60 years old, a strong negative correlation was found between age and cell abundance (Figure 4B), with donors over 50 years old having less than 1% of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells. Comparison of CD94<sup>+</sup> and CD94<sup>-</sup> cell subsets abundance revealed that CD3<sup>high</sup>CD94<sup>+</sup> cells having high cytotoxic capacity virtually disappeared by age 40 and were paralleled by a similar decrease from the more abundant CD94<sup>-</sup> subset (Figure 4C). The arrows in Figures 4B and 4C show a 39-year old donor who had high proportion of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells compared to age-matched donors, but analysis of the proportion

of each subsets highlights the exclusive increased presence of the CD3<sup>int</sup>CD94<sup>-</sup> subset. Given the lower proliferative response of CD94<sup>-</sup> cells to TCR engagement or IL-15 stimulation, this raises the question whether increased presence of CD94<sup>-</sup> cells was due to the differentiation of CD94<sup>+</sup> cells into CD94<sup>-</sup> cells and whether CD94 expression on memory T cells can be modulated.

### **Cell subsets express different NKG2 family member levels**

CD94 is a membrane protein forming heterodimers when associated with NKG2A, B, C or E. Expression of NKG2A mRNA, but not of NKG2C, can be correlated to surface expression of heterodimers. To evaluate the presence of activating or inhibiting NKG2 family members that could modulate T cell responses (14, 28, 29), semi-quantitative RT-PCR was performed. The expression of NKG2A, C, E and F and NKG2D mRNA were evaluated and mRNA for all these molecules were detected in CD94<sup>+</sup> memory T cells, while CD94<sup>-</sup> cells expressed much lower levels of NKG2A, C and E (typical result of n=3 shown in Figure 5A). Normalized results on actin show that CD94<sup>+</sup> cells express 4-fold higher levels of NKG2A, C and E mRNA compared to CD94<sup>-</sup> cells (Figure 5B, n=3). Since CD94 mRNA levels were similar in both subsets, lack of cell-surface CD94 expression by CD94<sup>-</sup> cells is likely due to reduced expression of NKG2 interaction partners. It is possible that NKG2 activating receptors expressed by CD56<sup>+</sup>CD3<sup>high</sup>CD94<sup>+</sup> cells could contribute to the increased TCR responsiveness and/or superior cytotoxicity observed when compared to the CD94<sup>-</sup> subset.

### **NKT cell subsets appear developmentally related**

CD94-NKG2A expression has been shown to be modulated (30) *in vitro* suggesting that NKR<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> memory T cell could differentiate into CD94<sup>-</sup> cells. The possible developmental relationship of both subsets was evaluated after 7 days of IL-15 or CD3-CD28 treatment, followed by double staining for CD94 and CD3 levels. Most CD94<sup>+</sup> cells treated with CD3 and CD28 switched from a perforin<sup>high</sup> to a perforin<sup>low</sup> phenotype and more than half became CD94 negative (Figure 6A, n=4). While CD3 and CD28 stimulation had no significant effects on perforin or CD94 expression in the CD94<sup>-</sup> subset, IL-15 treatment caused an increase in the number of CD94<sup>+</sup> cells in both subsets and a significant increase in the number of perforin<sup>high</sup> cells, as already shown by others (31). These results suggest that CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells can differentiate into one another depending on the stimulus. Since lack of CD94 cell-surface

expression in the CD94<sup>-</sup> subset appeared to be linked to low levels of NKG2 interaction partners (Figure 6B, n=4), NKG2 levels in CD94<sup>+</sup> cells after 7 days of TCR CD3-CD28 treatment were evaluated by RT-PCR. While the RNA message for CD94 remained strongly expressed, levels of NKG2A, C and E decreased significantly in close correlation to the number of cells having lost CD94 expression (Figure 6A). These data suggest that highly cytotoxic CD3<sup>high</sup>CD94<sup>+</sup> cells differentiate into low proliferative, low cytotoxic capacity CD3<sup>int</sup>CD94<sup>-</sup> cells upon TCR stimulation and that CD94 decreased expression is mediated by decreased NKG2 family member expression. On the other hand, IL-15 promotes increased perforin and CD94 levels in a fraction of CD94<sup>-</sup> cells.

## DISCUSSION

We have previously shown that a minor population of memory CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD56 and other NK markers is highly cytotoxic and can recruit cells of innate immunity by releasing chemokines upon Fas engagement (21). NKR acquisition by memory CTL is likely to modulate their functional abilities. For example, expression of CD56 by memory T cells has been correlated to their increased cytotoxicity (18). Also, NK cells can enhance T cell responses through NK cell-expressed CD244 and T cell-expressed CD48 interactions (32), and CD244 acquisition by CD8<sup>+</sup> T cells can provide similar co-stimulation between neighboring T cells (33). Finally, in acute myeloid leukemia, polyclonal proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells can occur and expanded CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells kill autologous leukemic cells in an MHC-unrestricted manner that relies on CD244 (34). NKR expression by memory CTL can thus have positive effects, but could also have disastrous consequences if T cell clones are not kept under tight control.

Since CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells expressing CD161 and CD244 consistently displayed bimodal CD3 expression levels (21), we hypothesized that it may represent functionally different subsets with roles attributed to inflammation or cancer immune surveillance. Intermediate level of CD3 expression is characteristic of many small subsets of T lymphocyte like CD1d-restricted NKT cells (24) and  $\gamma/\delta$  T cells (35), but the importance of that lower expression remains to be discovered even though current data suggest a role in TCR activation threshold (36). When the presence of other NKR in CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells was evaluated, it revealed that CD56<sup>+</sup>CD3<sup>high</sup> memory T cells exclusively expressed CD94 while CD3<sup>int</sup> did not, further suggesting that both subsets of T memory cells are functionally different. CD94 pairs with NKG2 family members to form inhibitory (A, B) or stimulatory (C, E, F, H) receptors (16). CD94-NKG2 heterodimers interact with HLA-E that presents peptides derived from HLA-A, B and C leader sequences allowing to “sense” MHC-I levels (37).

Differential expression of CD94 by the two CD56<sup>+</sup> memory T cell subsets might allow modulation of their functional properties. It has been shown that CD94 expression on CD8<sup>+</sup> T cells was associated with higher apoptosis threshold upon AICD induction (38). This resistance to apoptosis is associated with a pro-inflammatory function when the Fas receptor is engaged (21). We tested this capacity to release chemokines after FasL treatment and found that cells

from either subset were endowed with similar abilities to recruit NK cells and neutrophils. This is consistent with the observation that both subsets express similar Fas levels (21). Since we already showed that CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells are able to kill NK-sensitive and NK-insensitive targets (21), we tested cell subset killing with NK-insensitive targets. When this cytotoxicity was compared, it revealed that CD94<sup>+</sup> cells were three times more efficient than CD94<sup>-</sup> cells at killing NK-insensitive targets. Perforin staining was done to assess the cytotoxic granules potential of the two subsets and it revealed that CD94<sup>+</sup> cells expressed on average five time higher levels of perforin compared to CD94<sup>-</sup> cells, thus confirming the higher cytotoxic capacity of the cells. These data confirms that CD94/CD3 expression pattern on memory T cells allows the discerning of two subsets of CD56<sup>+</sup> T cells with different functional capacities.

Except for NKG2D that appears at the cell surface as a homodimer, CD94 is the pairing partner of the NKG2 family members. RT-PCR analysis revealed that three NKG2 family members (A, C and E) were expressed at much higher levels by CD94<sup>+</sup> cells compared to CD94<sup>-</sup> cells. While CD94 mRNA expression was similar in both subsets, cell-surface CD94 was only detected when high levels of NKG2A, C or E mRNA were expressed. It has been demonstrated that NKG2A mRNA detection could be correlated to the expression of the heterodimer, and that NKG2A inhibited NKG2C expression when both mRNA were detected (30). Thus, we can hypothesize that the population of CD94<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> memory T cells express primarily the CD94-NKG2A heterodimer which inhibitory function suggests that the high cytotoxicity of CD94<sup>+</sup> cells is not due to activating CD94-NKG2 signaling. But we cannot exclude the hypothesis that individual CD94<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T memory cell could be CD94-NKG2C or CD94-NKG2E positive, even though data from others suggests that all CD94<sup>+</sup> memory T cells express the inhibitory NKG2A family member (30). Thus, expression of CD94 on T memory cells is due to an increased expression of NKG2 family members that allows expression of the heterodimer at the surface.

Cell division studies were also undertaken to assess functional proliferation of these cell subsets. Since it has already been demonstrated that these cells are CD3 and CD28 positive (21), we stimulated CFSE loaded cells with immobilized CD3 and CD28 for 7 days. It revealed that CD56<sup>+</sup> memory T CD94<sup>-</sup> cells were markedly hypo-responsive when compared to CD94<sup>+</sup> cells, which proliferated to the same extent as CD8<sup>+</sup> T cells. Since both subsets responded equally well to PMA-ionomycin and to IL-15 stimulation, we conclude that CD56<sup>+</sup> memory T CD94<sup>-</sup> cells

possess the same proliferative potential but when stimulated through CD3 are not activated as much as CD94<sup>+</sup> cells or CD8<sup>+</sup> T cells.

Analysis of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cell abundance in young adults revealed major differences between time points within donors, suggesting that environmental factors contribute to the expansion and contraction of that cell population. Concurrently, it was recently shown that chronic mental distress can lead to increased CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cell numbers (39). While CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells are virtually absent from cord blood, CD8<sup>+</sup> T cells can gain CD56 expression in response to IL-15, however, these neonatal cells differ from adult CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells by their lack of CD161 and CD94 expression (40). The adult CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> described here responded poorly to IL-15 and already expressed several NKR, suggesting that IL-15 is a factor that might promote CD56 acquisition by naive cells and that memory cells may gain other NKR expression as part of a developmental program.

Analysis of the relative proportion of the two CD56<sup>+</sup> memory T cell subsets against age (20 to 60 years old) underlined a major decrease in the number of cells with increasing age and highlighted the almost complete disappearance of the CD94<sup>+</sup> subset by age 40 and its stabilization afterwards. In accordance with these data, a negative correlation between age and perforin content of CD8<sup>+</sup> T cell has already been demonstrated (41). Contrarily to popular belief, most NKR are not positively correlated with age. Analysis of the relative expression of nine NKR on T cells has shown that the average number of NKR<sup>+</sup> T cells is in fact slightly decreasing with advancing age (range between 20 and 80 years old) (15). On the other hand, positive correlation has been demonstrated for CD57 (2) and most specifically for KIR (42). But if expression of NKR like CD94 can be modulated by various stimuli, KIR cannot be induced on lymphocytes and their expression seems to be pre-determined (14) : KIR expression has been shown to reduce T cell sensitivity to AICD in humans (43) and with increasing age KIR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> memory T cell accumulate in mice (11).

Other studies have already looked into the proportion of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells in correlation with age (2, 44-46). In two studies comparing 50 years old to healthy centenarians, Miyaji were unable to show a significative increase in the number of CD56<sup>+</sup> T cells in the older subjects (2, 44). In another study, Sansoni compared percentage of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells in 138 subjects (4 to

106 years old), including 26 centenarians. They showed an increase of the cell population with increasing age (45), but exclusion of the less than 18 years old subjects, where there is a well documented increase of all T cell populations owing to high thymic output and where CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells are known to increase (40, 47), removes any positive correlation. Furthermore, the withdrawal from the cohort of the more than 80 years old subjects, to allow direct comparison with our data, results in a negative correlation similar to data presented in Figure 5 of the present article. In any cases, we found that inclusion of healthy centenarians (a rare event) would not reflect the variations seen in the general population and the increased numbers of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells in very old persons, which has also been documented in mice (48), may well be one day linked to their successful healthy state. The last study used 229 subjects aged between 18 and 99 years old and found an age correlated increase of the CD3<sup>+</sup>CD(56+16)<sup>+</sup> population (46). The conclusion of this large study cannot be ignored, but their usage of a combination of CD56 and CD16 antibodies targets a much larger T cell population than the CD56<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T cell subset characterized in this study, and CD16 has been shown to be expressed by many populations including IL-2 stimulated T cells (49) and  $\gamma/\delta$  T cells (50). Thus we can not compare both sets of data.

We can sum our data with the following: after peaking at the age of puberty, CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> memory T cells numbers decrease in a biphasic rate to stabilize at 5 times lower proportions after 40 years old. CD94<sup>+</sup> cells with high cytotoxic potential and good proliferative response following CD3-CD28 ligation are nearly undetectable at that age and this absence may be reflected in the immune response.

Following TCR engagement, over 50% of CD94<sup>+</sup> cells lost CD94 expression and the majority became perforin<sup>low</sup>. Loss of cell-surface CD94 was associated with decreased NKG2A, C and E expression, confirming the requirement of interaction partners for heterodimer expression. On the other hand, IL-15 treatment caused an increase in perforin levels in both subsets, consistent with the known ability of IL-15 to promote perforin expression in NK and CD8<sup>+</sup> T cells (51), and IL-15 also lead to increased numbers of CD94<sup>+</sup> cells in the CD94<sup>-</sup> subset. Thus, antigen-specific stimulation should promote the preferential proliferation of CD94<sup>+</sup> cells and subsequent differentiation into CD94<sup>-</sup> cells, while IL-15 should drive the expansion of both subsets and promote the development of the cytotoxic CD94<sup>+</sup> subset.

Although NKR-expressing memory T cells are a minor fraction of circulating lymphocytes, they

could contribute to tumor immune surveillance given their ability to kill NK-sensitive and NK-resistant targets. On the other hand, these cells could contribute to inflammation given their ability to recruit cells of the innate immune system. Alterations in CD56<sup>+</sup> memory T cell function and/or abundance could be associated to pathologies and it would be of interest to evaluate the number and functionality of these cells in individuals suffering from autoimmune diseases or cancer.

## **ACKNOWLEDGMENT**

We are grateful to Dr Jacques Thibodeau for providing access to the Université of Montréal FACS sorting facility and to Serge Sénéchal for performing cell sorting.

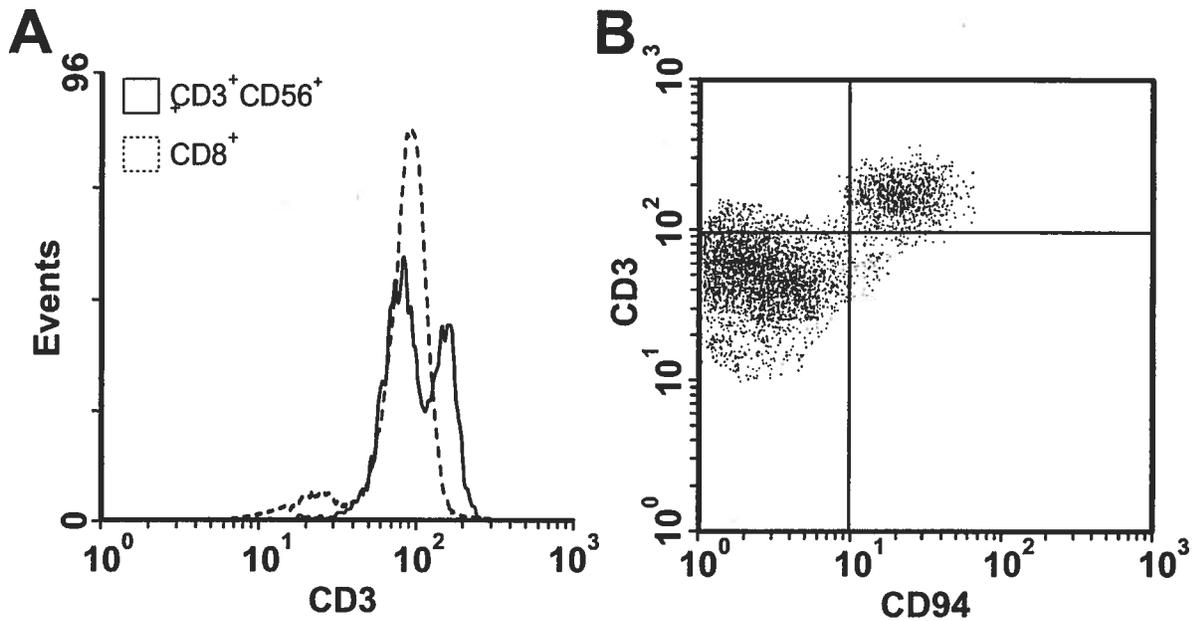
## REFERENCES

1. Doherty, D. G., S. Norris, L. Madrigal-Estebas, G. McEntee, O. Traynor, J. E. Hegarty, and C. O'Farrelly. 1999. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 163:2314.
2. Miyaji, C., H. Watanabe, M. Minagawa, H. Toma, T. Kawamura, Y. Nohara, H. Nozaki, Y. Sato, and T. Abo. 1997. Numerical and functional characteristics of lymphocyte subsets in centenarians. *J Clin Immunol* 17:420.
3. Lanier, L. L., C. Chang, and J. H. Phillips. 1994. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol* 153:2417.
4. Takayama, E., Y. Koike, T. Ohkawa, T. Majima, M. Fukasawa, N. Shinomiya, T. Yamaguchi, M. Konishi, H. Hiraide, T. Tadakuma, and S. Seki. 2003. Functional and Vbeta repertoire characterization of human CD8+ T-cell subsets with natural killer cell markers, CD56+ CD57- T cells, CD56+ CD57+ T cells and CD56- CD57+ T cells. *Immunology* 108:211.
5. Ochi, H., and T. Watanabe. 2000. Negative regulation of B cell receptor-mediated signaling in B-1 cells through CD5 and Ly49 co-receptors via Lyn kinase activity. *Int Immunol* 12:1417.
6. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727.
7. Speiser, D. E., M. Colonna, M. Ayyoub, M. Cella, M. J. Pittet, P. Batard, D. Valmori, P. Guillaume, D. Lienard, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2001. The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8+ effector alpha beta T cells. *J Immunol* 167:6165.
8. Dellabona, P., E. Padovan, G. Casorati, M. Brockhaus, and A. Lanzavecchia. 1994. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* 180:1171.
9. McMahon, C. W., and D. H. Raulet. 2001. Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol* 13:465.
10. Mingari, M. C., M. Ponte, C. Vitale, R. Bellomo, and L. Moretta. 2000. Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function. *Hum Immunol* 61:44.
11. Ugolini, S., C. Arpin, N. Anfossi, T. Walzer, A. Cambiaggi, R. Forster, M. Lipp, R. E. Toes, C. J. Melief, J. Marvel, and E. Vivier. 2001. Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2:430.
12. Ikeda, H., B. Lethe, F. Lehmann, N. van Baren, J. F. Baurain, C. de Smet, H. Chambost, M. Vitale, A. Moretta, T. Boon, and P. G. Coulie. 1997. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6:199.

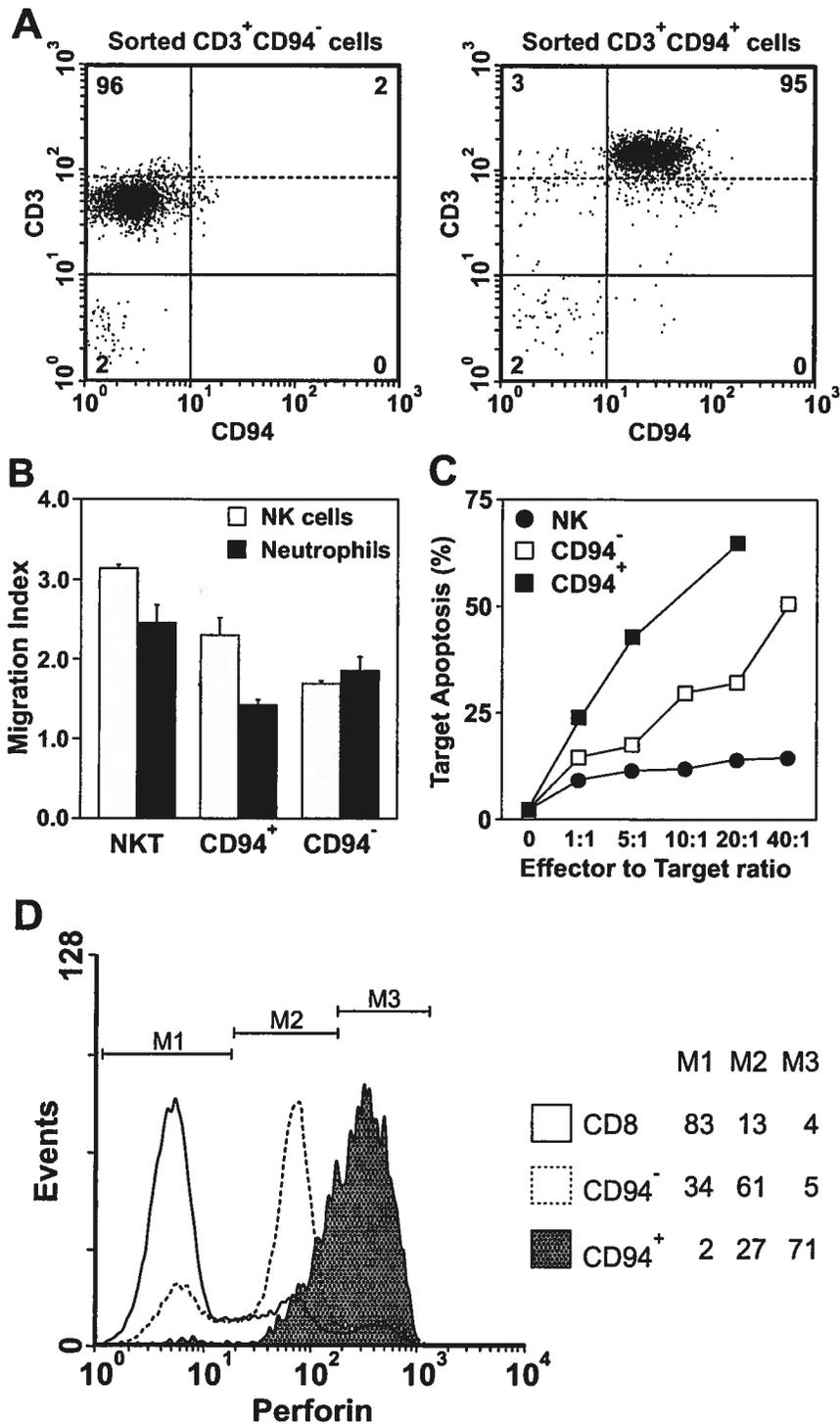
13. Pauza, M., K. M. Smith, H. Neal, C. Reilly, L. L. Lanier, and D. Lo. 2000. Transgenic expression of Ly-49A in thymocytes alters repertoire selection. *J Immunol* 164:884.
14. Huard, B., and L. Karlsson. 2000. KIR expression on self-reactive CD8+ T cells is controlled by T-cell receptor engagement. *Nature* 403:325.
15. Speiser, D. E., D. Valmori, D. Rimoldi, M. J. Pittet, D. Lienard, V. Cerundolo, H. R. MacDonald, J. C. Cerottini, and P. Romero. 1999. CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur J Immunol* 29:1990.
16. Moser, J. M., J. Gibbs, P. E. Jensen, and A. E. Lukacher. 2002. CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses. *Nat Immunol* 3:189.
17. Werwitzke, S., A. Tiede, B. E. Drescher, R. E. Schmidt, and T. Witte. 2003. CD8beta/CD28 expression defines functionally distinct populations of peripheral blood T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 133:334.
18. Pittet, M. J., D. E. Speiser, D. Valmori, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2000. Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression. *J Immunol* 164:1148.
19. Lanier, L. L., C. Chang, M. Azuma, J. J. Ruitenber, J. J. Hemperly, and J. H. Phillips. 1991. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 146:4421.
20. Schmidt-Wolf, G. D., R. S. Negrin, and I. G. Schmidt-Wolf. 1997. Activated T cells and cytokine-induced CD3+CD56+ killer cells. *Ann Hematol* 74:51.
21. Giroux, M., and F. Denis. 2005. CD1d-unrestricted human NKT cells release chemokines upon Fas engagement. *Blood* 105:703.
22. Aubry, J. P., A. Blaecke, S. Lecoanet-Henchoz, P. Jeannin, N. Herbault, G. Caron, V. Moine, and J. Y. Bonnefoy. 1999. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry* 37:197.
23. Kavelaars, A., A. Vroon, R. P. Raatgever, A. M. Fong, R. T. Premont, D. D. Patel, R. J. Lefkowitz, and C. J. Heijnen. 2003. Increased acute inflammation, leukotriene B4-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6. *J Immunol* 171:6128.
24. Fowlkes, B. J., A. M. Kruisbeek, H. Ton-That, M. A. Weston, J. E. Coligan, R. H. Schwartz, and D. M. Pardoll. 1987. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 329:251.
25. Natarajan, K., N. Dimasi, J. Wang, R. A. Mariuzza, and D. H. Margulies. 2002. Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu Rev Immunol* 20:853.
26. Sprent, J. 2003. Turnover of memory-phenotype CD8+ T cells. *Microbes Infect* 5:227.
27. Burkett, P. R., R. Koka, M. Chien, S. Chai, D. L. Boone, and A. Ma. 2004. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15Ralpha and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis. *J Exp Med* 200:825.

28. Saurer, L., I. Seibold, C. Vallan, W. Held, and C. Mueller. 2003. Cutting edge: stimulation with the cognate self-antigen induces expression of the Ly49A receptor on self-reactive T cells which modulates their responsiveness. *J Immunol* 171:6334.
29. Halary, F., M. A. Peyrat, E. Champagne, M. Lopez-Botet, A. Moretta, L. Moretta, H. Vie, J. J. Fournie, and M. Bonneville. 1997. Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *Eur J Immunol* 27:2812.
30. Arlettaz, L., J. Villard, C. de Rham, S. Degermann, B. Chapuis, B. Huard, and E. Roosnek. 2004. Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8+ TCR alphabeta lymphocytes. *Eur J Immunol* 34:3456.
31. Mingari, M. C., C. Vitale, C. Cantoni, R. Bellomo, M. Ponte, F. Schiavetti, S. Bertone, A. Moretta, and L. Moretta. 1997. Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 27:1374.
32. Assarsson, E., T. Kambayashi, J. D. Schatzle, S. O. Cramer, A. von Bonin, P. E. Jensen, H. G. Ljunggren, and B. J. Chambers. 2004. NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* 173:174.
33. Kambayashi, T., E. Assarsson, B. J. Chambers, and H. G. Ljunggren. 2001. Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *J Immunol* 167:6706.
34. Costello, R. T., S. Sivori, F. Mallet, D. Sainty, C. Arnoulet, D. Reviron, J. A. Gastaut, A. Moretta, and D. Olive. 2002. A novel mechanism of antitumor response involving the expansion of CD3+/CD56+ large granular lymphocytes triggered by a tumor-expressed activating ligand. *Leukemia* 16:855.
35. Lambert, C., and C. Genin. 2004. CD3 bright lymphocyte population reveal gammadelta T cells. *Cytometry* 61B:45.
36. Jang, I. K., and H. Gu. 2003. Negative regulation of TCR signaling and T-cell activation by selective protein degradation. *Curr Opin Immunol* 15:315.
37. Braud, V. M., D. S. Allan, and A. J. McMichael. 1999. Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol* 11:100.
38. Gunturi, A., R. E. Berg, and J. Forman. 2003. Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94. *J Immunol* 170:1737.
39. Lutgendorf, S. K., M. B. Moore, S. Bradley, B. J. Shelton, and C. T. Lutz. 2005. Distress and expression of natural killer receptors on lymphocytes. *Brain Behav Immun* 19:185.
40. Cookson, S., and D. Reen. 2003. IL-15 drives neonatal T cells to acquire CD56 and become activated effector cells. *Blood* 102:2195.
41. Rukavina, D., G. Laskarin, G. Rubesa, N. Strbo, I. Bedenicki, D. Manestar, M. Glavas, S. E. Christmas, and E. R. Podack. 1998. Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Blood* 92:2410.

42. Anfossi, N., V. Pascal, E. Vivier, and S. Ugolini. 2001. Biology of T memory type 1 cells. *Immunol Rev* 181:269.
43. Arlettaz, L., S. Degermann, C. De Rham, E. Roosnek, and B. Huard. 2004. Expression of inhibitory KIR is confined to CD8+ effector T cells and limits their proliferative capacity. *Eur J Immunol* 34:3413.
44. Miyaji, C., H. Watanabe, H. Toma, M. Akisaka, K. Tomiyama, Y. Sato, and T. Abo. 2000. Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians. *Hum Immunol* 61:908.
45. Sansoni, P., A. Cossarizza, V. Brianti, F. Fagnoni, G. Snelli, D. Monti, A. Marcato, G. Passeri, C. Ortolani, E. Forti, and et al. 1993. Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood* 82:2767.
46. McNerlan, S. E., I. M. Rea, H. D. Alexander, and T. C. Morris. 1998. Changes in natural killer cells, the CD57CD8 subset, and related cytokines in healthy aging. *J Clin Immunol* 18:31.
47. Musha, N., Y. Yoshida, S. Sugahara, S. Yamagiwa, T. Koya, H. Watanabe, K. Hatakeyama, and T. Abo. 1998. Expansion of CD56+ NK T and gamma delta T cells from cord blood of human neonates. *Clin Exp Immunol* 113:220.
48. Mocchegiani, E., R. Giacconi, C. Cipriano, N. Gasparini, G. Bernardini, M. Malavolta, M. Menegazzi, E. Cavaliere, M. Muzzioli, A. R. Ciampa, and H. Suzuki. 2004. The variations during the circadian cycle of liver CD1d-unrestricted NK1.1+TCR gamma/delta+ cells lead to successful ageing. Role of metallothionein/IL-6/gp130/PARP-1 interplay in very old mice. *Exp Gerontol* 39:775.
49. Nitta, T., M. Nakata, H. Yagita, and K. Okumura. 1991. Interleukin-2 activated T cells (T-LAK) express CD16 antigen and are triggered to target cell lysis by bispecific antibody. *Immunol Lett* 28:31.
50. Oshimi, K., Y. Oshimi, O. Yamada, M. Wada, T. Hara, and H. Mizoguchi. 1990. Cytotoxic T lymphocyte triggering via CD16 is regulated by CD3 and CD8 antigens. Studies with T cell receptor (TCR)-alpha beta+/CD3+16+ and TCR-gamma delta+/CD3+16+ granular lymphocytes. *J Immunol* 144:3312.
51. Obata-Onai, A., S. Hashimoto, N. Onai, M. Kurachi, S. Nagai, K. Shizuno, T. Nagahata, and K. Matsushima. 2002. Comprehensive gene expression analysis of human NK cells and CD8(+) T lymphocytes. *Int Immunol* 14:1085.

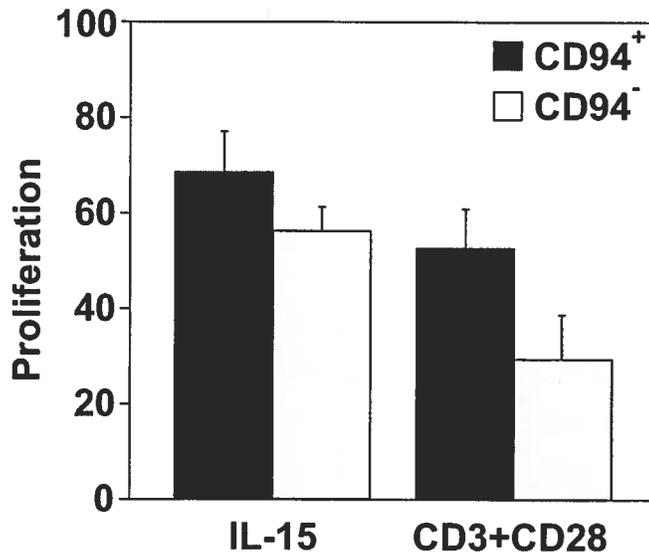
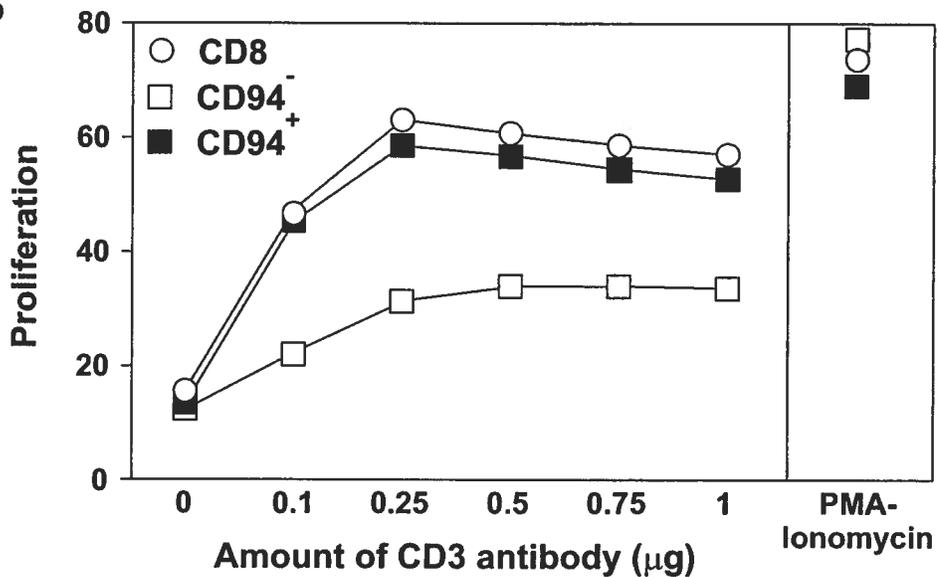


**Figure 1** CD56<sup>+</sup> memory T cells are composed of two distinct subsets  
 Representative cytometry staining of 85 venipunctures (A) CD3 staining of CD8<sup>+</sup> T cells (dashed line) and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> cells (solid line). (B) CD3 and CD94 double staining of purified CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells.

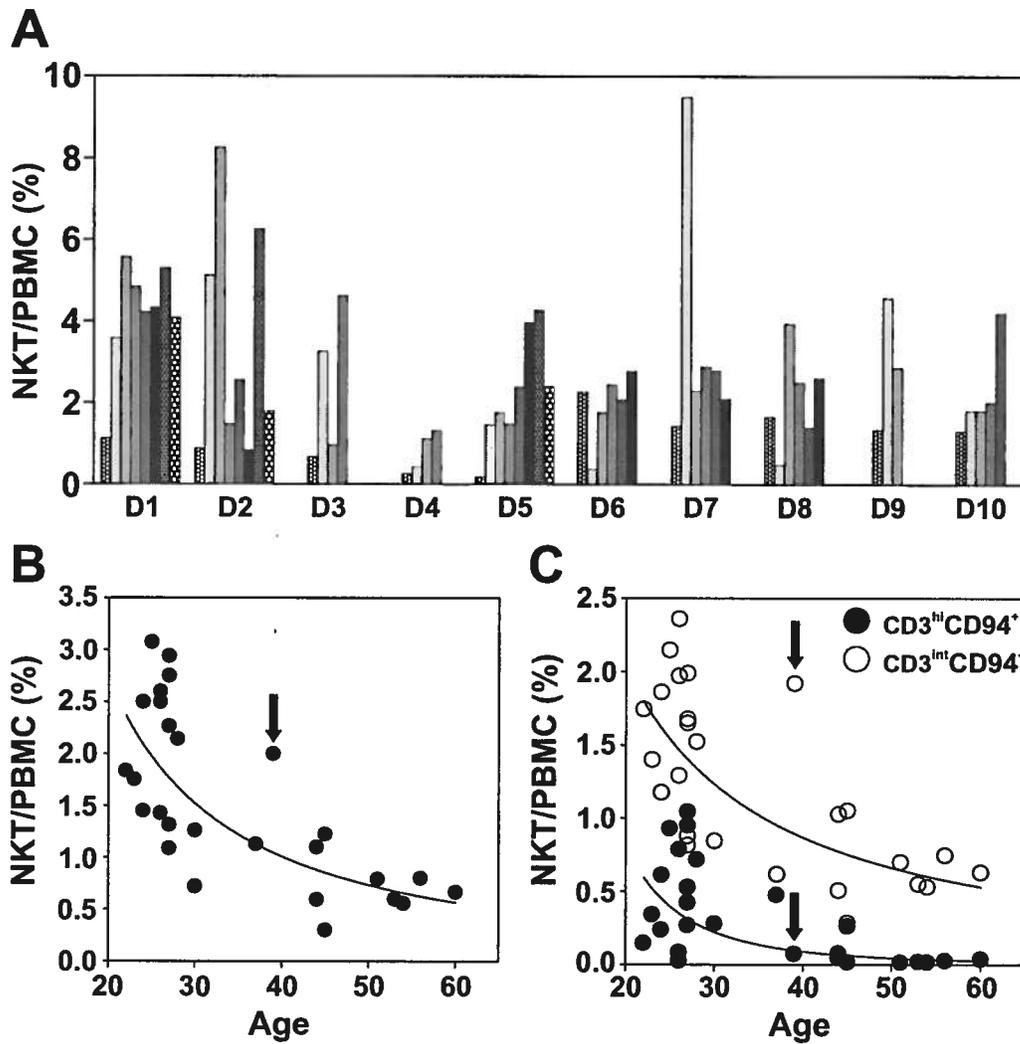


**Figure 2. Functional abilities of purified CD56<sup>+</sup> memory T cell subsets.**

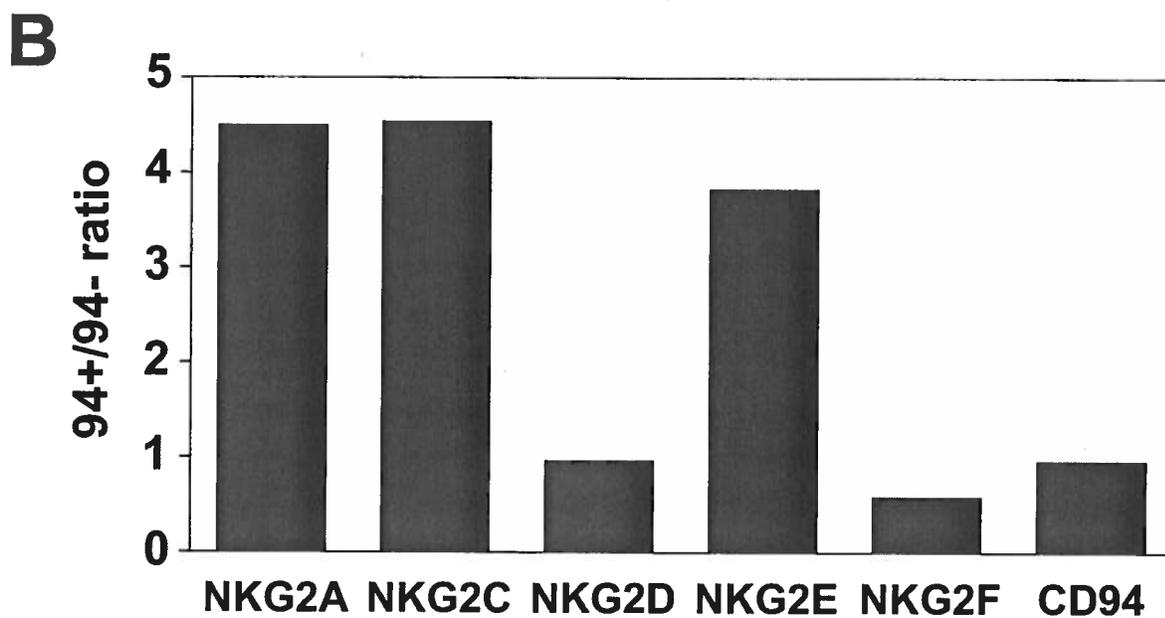
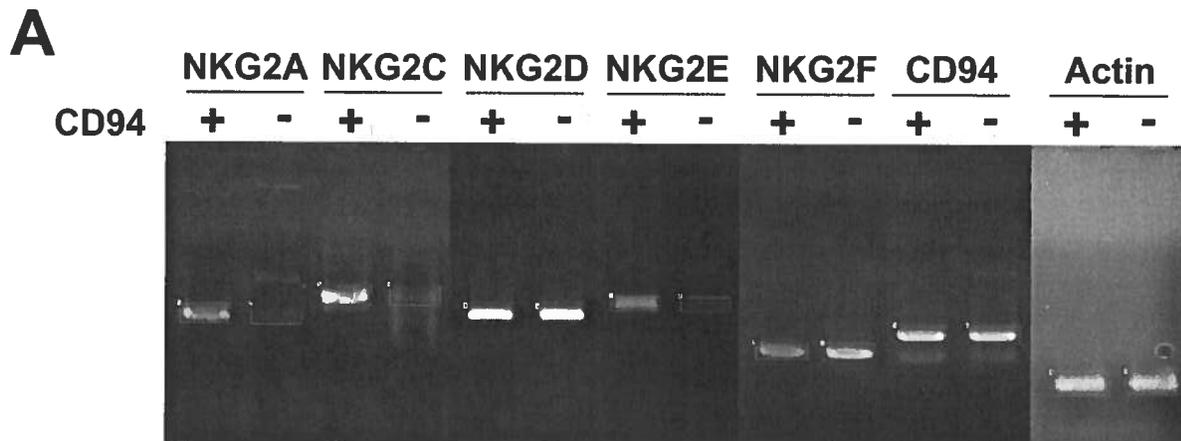
(A) Representative staining of the purity of CD56<sup>+</sup> memory T cell subsets after cell-sorting with CD94 and CD3 antibodies. (B) Ability of cell subsets to induce FasL-mediated neutrophil (black) and NK cell recruitment *in vitro*. (n=3) (C) Cytotoxicity of NK cells (filled circle), CD94<sup>-</sup> cells (open square) and CD94<sup>+</sup> cells (filled square) to kill NK-resistant Raji cells. Cells were cultured with 10 U/ml IL-2 for 5 days and incubated with target cells 4 h at different effector to target ratios. After gating targets by forward and side scatter, Annexin V-PE<sup>+</sup> and 7-AAD<sup>-</sup> cells were scored as apoptotic (D) Intracellular perforin staining of CD8<sup>+</sup> T cells (solid line), CD94<sup>-</sup> cells (dashed line) and CD94<sup>+</sup> cells (gray). The percentage of perforin positive cells in each gate is shown to the right (n=5).

**A****B**

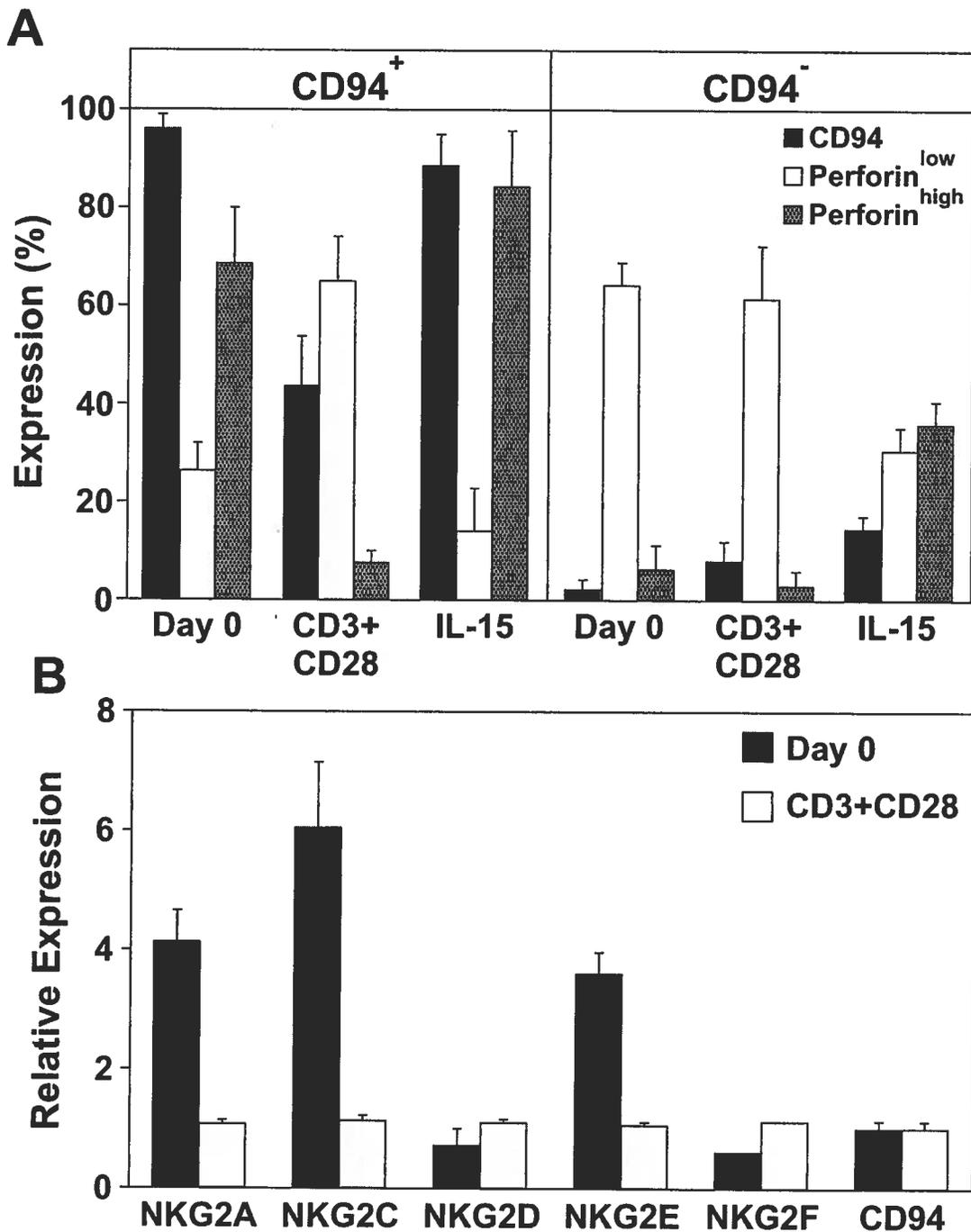
**Figure 3** *In vitro* proliferation of CD56<sup>+</sup> memory T cell subsets. (A) CD94<sup>+</sup> (black) and CD94<sup>-</sup> (white) CD56<sup>+</sup> memory cell subsets stained with CFSE and the percentage of cells having divided at least once after 7 days of treatment with 10 ng/ml IL-15 or 0.2 μg/ml CD3 with 1 μg/ml CD28 and 1 μg/ml Protein G were compared. (B) Proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells (open circles), CD94<sup>-</sup> cell subset (open squares) and CD94<sup>+</sup> cell subset (filled squares) in response to different doses of immobilized CD3 antibody and a constant amount of cross-linked CD28 antibody (1 μg/ml CD28 and 1 μg/ml Protein G). The PMA-ionomycin positive control is shown to the right.



**Figure 4.** The abundance of NKR-expressing memory T cells is affected by the environment and aging . (A) The percentage of total CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells in 10 different donors aged between 22 and 28 years old was assessed over a one year period for 58 independent experiments. (B) Age-related decrease of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> levels in PBMC obtained from 27 different donors aged from 22 to 60 years old. (C) Age-related decrease in the proportion of CD94<sup>+</sup> and CD94<sup>-</sup> subsets in CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells obtained from 27 different donors (22 to 60 years old). The arrows in panels B and C illustrate a 39 year old donor with high levels of total CD56<sup>+</sup> memory T NKT cells but virtually no CD94<sup>+</sup> subset.



**Figure 5** NKG2 family member expression in both CD56<sup>+</sup> memory T cell subsets. RT-PCR was performed on total RNA obtained from  $3 \times 10^5$  CD94<sup>+</sup> and CD94<sup>-</sup> cell subsets. (A) Agarose-fractionated PCR products were quantified by densitometry. (B) Values from each subsets were normalized against the  $\beta$ -actin signal and expressed as fold increase by dividing values obtained with CD94<sup>+</sup> cells by those obtained with CD94<sup>-</sup> cells.



**Figure 6.** *In vitro* differentiation of CD56<sup>+</sup> memory T cells. CD94<sup>+</sup> cells were cultured 7 days in the presence of 0.5  $\mu$ g/ml immobilized anti-CD3 and cross-linked CD28 antibody (1  $\mu$ g/ml CD28 and 1  $\mu$ g/ml Protein G) or 10 ng/ml IL-15 (A) Cells were stained with CD94, CD3 and intracellular perforin antibodies and analyzed by flow cytometry. The percentage of cells expressing CD94 and high levels of CD3 (black), low levels of perforin (white) and high levels of perforin (gray) is shown. (B) RT-PCR was performed on total RNA and PCR product amounts were quantified by densitometry. Values normalized against  $\beta$ -actin show relative expression levels between purified CD94<sup>+</sup> and CD94<sup>-</sup> cells at time 0 (black) and levels in CD94<sup>+</sup> cells after 7 days of anti-CD3 treatment compared to CD94<sup>-</sup> cells before treatment (white).

#### CHAPITRE 4 : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES NON PUBLIÉS

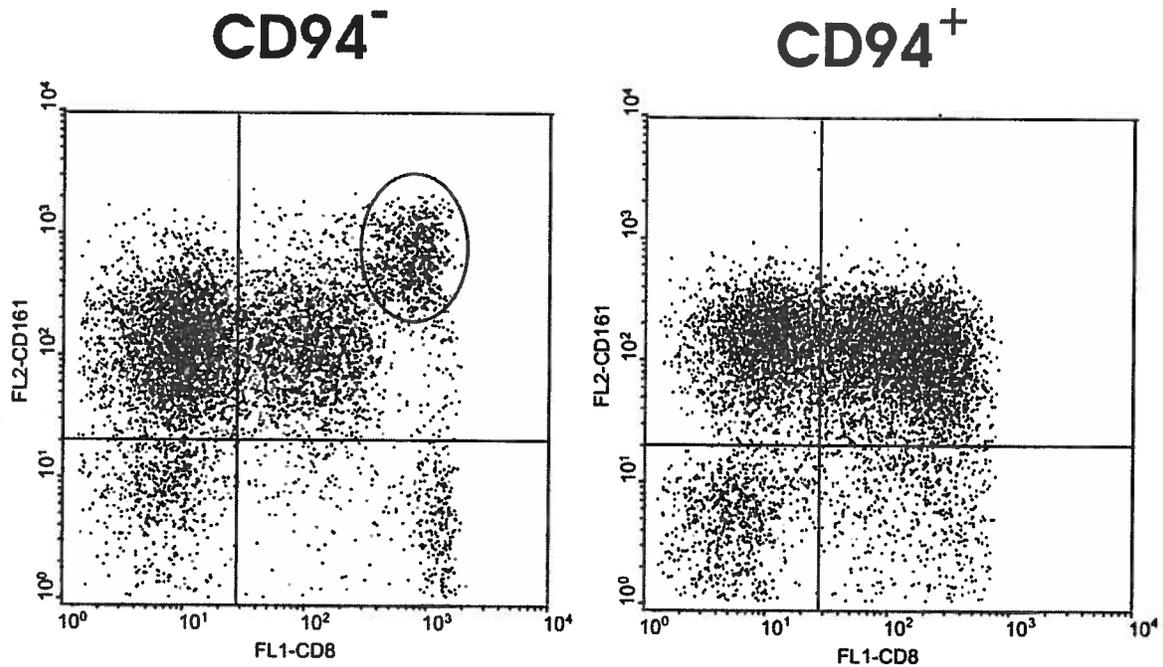
---

Lors de la caractérisation phénotypique des cellules NKT-like CD45RO<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, deux résultats se sont avérés intrigants, mais déviaient du sujet principal donné à chacun des articles. Ce chapitre-ci est divisée en deux parties pour interpréter et discuter individuellement ces résultats.

##### Identification d'une sous-population de NKT-like CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD161<sup>élevé</sup>

Pour mieux caractériser phénotypiquement les 2 sous-populations de NKT-like CD56<sup>+</sup> CD3<sup>bas</sup> et CD3<sup>élevé</sup>, nous avons incubé les cellules avec plusieurs anticorps dirigés contre des antigènes de surface de cellules T mémoires et de cellules NK. Outre l'expression différentielle obtenue avec les anticorps monoclonaux dirigés contre CD94, nous avons observé la présence d'une population distincte de petite taille. Cette population s'est avérée faire partie des cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> CD3<sup>bas</sup>CD94<sup>-</sup> et est caractérisée par une expression très élevée du NKR CD161 ainsi qu'une forte expression de CD8 (Figure 4).

Cette sous-population de cellules NKT-like a été décelée chez tous les donneurs testés et sa taille était très variable, représentant en moyenne 27 % des CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup>, avec un minimum de 6 % et un maximum de 80 % (n=22). Malgré cette grande variabilité et contrairement aux 2 groupes principaux de cellules NKT-like CD56<sup>+</sup>, aucune corrélation n'a pu être établie entre la taille de cette population et l'âge ou le sexe des donneurs. Finalement, la stimulation de cellules NKT-like CD94<sup>-</sup> par la cytokine IL-15 semble favoriser l'expression de CD161<sup>élevé</sup> par une fraction de ces cellules, mais ce résultat était non significatif.



**Figure 4. Expression de CD161 chez les sous-populations de cellules T CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>.**

Les sous-populations CD94<sup>+</sup> et CD94<sup>-</sup> de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ont été isolées puis marquées par anti-CD8 et anti-CD161. La présence d'une population distincte CD8<sup>élevé</sup>CD161<sup>élevé</sup> est encadrée dans la population CD94<sup>-</sup>.

Le profil d'expression de CD161 a été évalué chez les sous-populations de cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> CD94<sup>+</sup> et CD94<sup>-</sup> en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre CD161. Cependant, la grande variabilité de la quantité de cellules obtenues à chaque véniponction ainsi que l'absence d'anticorps spécifiques démarquant ces cellules par un facteur de plus de 10 en cytométrie (pour obtenir des populations nettes lors de FACS), ont fait que nous n'avons pas analysé plus amplement cette population. L'expression de CD161 chez cette sous-population est plus élevée (½ log) que chez les autres cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> (Figure 4) et les cellules NK (résultat non illustré).

Ceci soulève donc la possibilité que ce récepteur possède un rôle important et particulier chez ces cellules NKT-like CD8<sup>+</sup>. Le rôle précis de l'expression de CD161 par des lymphocytes T n'a pas encore été élucidé chez l'homme et les données disponibles suggèrent une fonction co-stimulatrice lors de la reconnaissance de CD1d par le TCR des cellules NKT classiques (314). L'étude des fonctions de cette population CD161<sup>élevé</sup> notamment après l'activation des cellules via ce récepteur par des anticorps immobilisés ou sa neutralisation par des anticorps solubles pourrait donc permettre d'élucider la fonction de cette protéine. Un élément de réponse suggéré par la grande variabilité de ce groupe et l'absence de corrélation avec l'âge est que les cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> CD161<sup>élevé</sup> pourraient apparaître de façon transitoire suite à une infection et la présence de CD161<sup>élevé</sup> pourrait participer à la résolution de celle-ci. L'étude future de cette population particulière de cellules NKT-like pourrait par conséquent éclaircir plusieurs points sur l'ontogénie de cellules NKT-like, ainsi que la fonction de CD161 et les stimuli permettant son expression.

### Expression de l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ par des NKT-like.

Lors de la caractérisation phénotypique des cellules NKT-like CD56<sup>+</sup>, nous avons remarqué qu'elles sont majoritairement CD8<sup>+</sup>, mais le niveau d'expression de CD8 était intermédiaire par rapport au niveau retrouvé chez les cellules T CD8<sup>+</sup> naïves. Ces niveaux intermédiaires pourraient être expliqués par une expression différentielle selon que le CD8 exprimé est la forme homodimérique  $\alpha\alpha$  ou hétérodimérique  $\alpha\beta$ . Lorsque nous avons coloré les cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> avec des anticorps monoclonaux dirigés contre l'hétérodimère  $\alpha\beta$  et contre la chaîne  $\alpha$ , nous avons observé que ces cellules NKT-like se divisaient en trois groupes majeurs et à peu près égaux : CD8 négatives, CD8 $\alpha\alpha$  et CD8 $\alpha\beta$ .

Après avoir identifié les deux populations majeures CD94<sup>+</sup> et CD94<sup>-</sup> de NKT-like CD56<sup>+</sup>, nous avons à nouveau caractérisé les chaînes de CD8 exprimées par les cellules NKT-like CD8<sup>+</sup>. Les deux groupes comportaient un pourcentage significatif de cellules CD8 $\alpha\alpha$ . La majorité (60 %) des cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> étaient CD8<sup>+</sup>, mais alors que seulement 35 +/- 7 % des CD8<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup> exprimaient l'homodimère, ce nombre augmentait à 60 +/- 15 % chez les cellules NKT-like CD8<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>. Ces résultats ouvraient la voie à plusieurs hypothèses difficiles à prouver, par exemple une origine extra-thymique éventuelle ou des propriétés auto-réactives pour les cellules exprimant la forme homodimérique de CD8 $\alpha\alpha$ . De plus, des résultats similaires ont été rapportés par d'autres équipes utilisant des approches différentes (298, 315-318). Nous avons omis ces résultats des articles de caractérisation des cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> pour fournir une discussion plus claire et concise expliquant les points essentiels de cette étude.

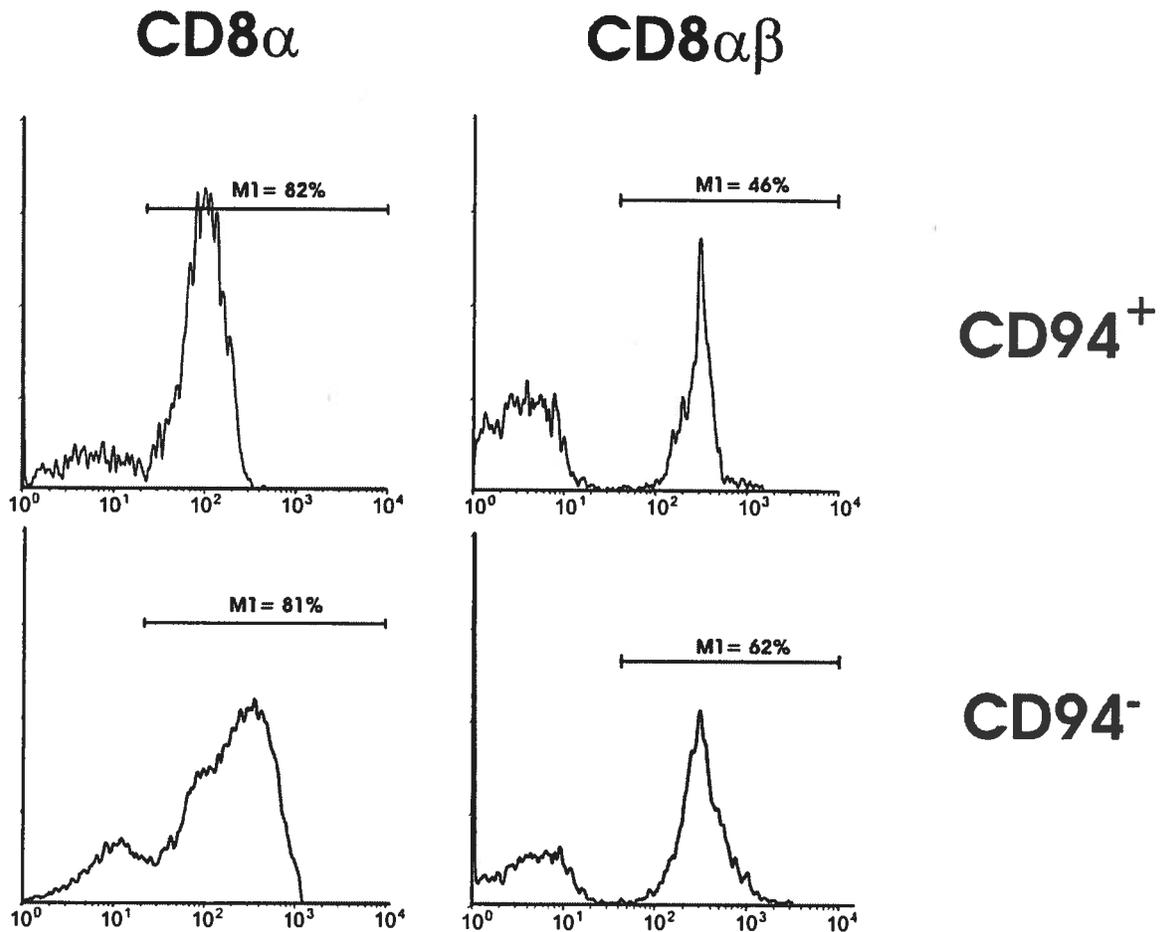
Il est connu que l'expression de CD8 $\alpha\alpha$  par rapport à CD8 $\alpha\beta$  est liée à une activation cellulaire via le TCR moins efficace. Bien que la chaîne  $\alpha$  forme 70 % de la surface de contact avec CMH-I et que la queue cytoplasmique interagisse avec les protéines activatrices p56-lck et LAT, la palmitoylation de la

chaîne  $\beta$  permet la localisation du co-récepteur aux radeaux lipidiques auprès du complexe TCR-CD3 et augmente l'efficacité de signalisation (319). Ceci suggère que l'expression préférentielle de l'homodimère par les cellules CD94<sup>+</sup> permettrait d'augmenter le seuil d'activation pour limiter les réponses cellulaires.

Il a été suggéré que l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$  serait exprimé préférentiellement par les cellules T thymo-indépendantes (320). Chez les souris thymectomisées n'ayant pratiquement pas de cellules T, des quantités normales de cellules NKT-like (non-restreintes par CD1d) sont retrouvées, suggérant que celle-ci soient d'origine extra-thymique (237). De plus, un nombre significatif de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> sont présentes chez les souris NUDE athymiques (301, 302). Il a été proposé que l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$  serait exprimé préférentiellement par les lymphocytes T auto-réactifs (296). Il est donc possible qu'un pourcentage important de cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> soient auto-réactives, malheureusement cette hypothèse ne peut être aisément démontrée chez l'humain. Par contre, la plupart des cellules CD8 $\alpha\alpha$  présentent dans la circulation sanguine avaient le phénotype de cellules mémoires et la présence de NKR activateurs chez ces cellules pourrait augmenter leur pouvoir cytotoxique envers les cellules NK-sensibles et NK-résistantes (298). Des analyses de diversité du TCR chez les lymphocytes CD8 $\alpha\alpha$  ont démontré que ces cellules étaient oligoclonales et que des clones identiques se retrouvaient dans la population CD8 $\alpha\beta$  indiquant ainsi que les lymphocytes CD8 $\alpha\beta$  peuvent devenir des cellules CD8 $\alpha\alpha$  (295). Une des causes pour cette diminution d'expression de la chaîne  $\beta$  serait l'acquisition de co-récepteurs comme le CD244 qui compenserait pour la signalisation réduite avec CD8.

Une étude comparative entre la capacité proliférative et les fonctions cytotoxiques et sécrétrices des trois populations de cellules NKT-like définies par l'expression de CD8 (négative, homodimérique et hétérodimérique) permettrait une meilleure compréhension du rôle de l'expression de CD8 $\alpha\alpha$ . La coloration de cellules NKT-like avec des tétramères de CMH-I présentant des antigènes du soi (ex. : MART/MelanA) pourrait renforcer l'hypothèse suggérant que les

cellules NKT-like CD8 $\alpha\alpha$  sont auto-réactives. Si effectivement des cellules NKT-like sont auto-réactives, leur activation inappropriée pourrait avoir des conséquences désastreuses. L'expression de l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$  pourrait donc faire partie d'un programme développemental assurant que les cellules T mémoires stimulées de manière chronique par les antigènes du soi requièrent un niveau d'activation supérieur. Il a par ailleurs été démontré que les cellules T CD8 $\alpha\alpha$  peuvent survivre à la sélection négative et ont une forte chance d'être auto-réactives (321). De plus, seules les souris mâles développent des cellules T auto-réactives (contre l'antigène mâle H-Y) après une thymectomie ce qui suggère que les cellules T thymo-indépendantes peuvent être auto-réactives (300). Il a été suggéré que l'expression de NKR inhibiteurs serait induite chez les cellules T CD8<sup>+</sup> activées par des antigènes du soi afin de maintenir la tolérance périphérique (290).



**Figure 5. Expression du co-récepteur CD8 chez les cellules T CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>.**

Le profil d'expression des dimères de CD8 a été évalué chez les sous-populations de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> CD94<sup>+</sup> et CD94<sup>-</sup> par coloration en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre CD8 $\alpha$  et CD8 $\alpha\beta$ . Le différentiel entre les colorations anti-CD8 $\alpha$  et anti-CD8 $\alpha\beta$  démontre qu'une proportion importante de cellules expriment CD8 $\alpha\alpha$  (19 % chez les CD94<sup>-</sup> et 36 % chez les CD94<sup>+</sup> dans cet exemple ci).

### ***3<sup>e</sup> Partie : Discussion et conclusion***

*Chapitre 5 : Discussion générale*

*Chapitre 6 : Conclusion*

*Chapitre 7 : Remerciements*

## **CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE**

---

Considérant que les résultats de cette thèse de doctorat ont déjà été analysés et discutés dans les conclusions des publications s'y rattachant, ce chapitre se limitera à une brève révision des points majeurs de ces conclusions pour établir l'importance de ces nouvelles données relativement aux connaissances actuelles. Ce chapitre sera divisé en deux sections reflétant ainsi les deux articles majeurs de cette thèse.

## Section I : Discussion de l'article I

Plusieurs études ont démontré que les neutrophiles pouvaient être directement attirés par un gradient de FasL (85, 86), mais ces résultats n'ont pas pu être confirmés par d'autres laboratoires (88, 89). Cette controverse au sujet de l'activité chimiotactique de FasL nous a poussés à évaluer ce phénomène. L'article intitulé « *Les cellules NKT non restreintes par CD1d sécrètent des chimiokines suite à l'engagement de Fas* », démontre que les neutrophiles ne migrent pas vers un gradient de FasL même lorsque sont reproduites les conditions de migration d'un article rapportant l'attraction directe des neutrophiles par FasL (86). Cette différence avec les autres études (85, 86) pourrait s'expliquer par l'utilisation de méthodes de purification différentes. En utilisant une sélection des neutrophiles par billes magnétiques, nous avons réduit au minimum le nombre de centrifugation/resuspension qui sont connues pour activer les neutrophiles (62).

Puisque plusieurs études *in vivo* et *in vitro* suggéraient que d'autres types de cellules immunitaires pourraient être impliqués dans le recrutement des neutrophiles par FasL (90-92), nous avons évalué la participation de diverses sous-populations de leucocytes dans ce phénomène. Parmi toutes les sous-populations testées, le groupe de cellules caractérisées par l'expression de CD3, CD56 et CD8 s'est avéré capable d'induire rapidement le recrutement de neutrophiles lorsqu'en présence de FasL. Parallèlement, une étude avait identifié les monocytes comme étant la sous-population de leucocytes requise pour la migration indirecte des neutrophiles en présence de FasL (89), mais cette migration n'était apparente qu'après 15 à 18 h et ne se compare donc pas à ce que nous avons observé (2h). Pour mieux évaluer l'impact de nos résultats, nous avons analysé la migration des autres sous-populations de leucocytes vers les cellules CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> en présence de FasL. Nous avons ainsi démontré que non seulement les neutrophiles étaient recrutés, mais aussi les cellules NK et les

monocytes/macrophages. Toutes ces cellules ont en commun de faire partie du système immunitaire inné.

L'expression de CD56 par les cellules T nous a amenés à nous interroger sur le pouvoir cytotoxique de ces NKT-like puisqu'une relation positive entre l'expression de CD56 et la lyse de cellules cibles avait été démontrée (183, 271). Par contre le rôle précis de CD56 reste incertain puisque cette molécule d'adhésion ne semble pas requise pour induire une signalisation (322). Les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ont démontré une cytotoxicité très forte envers des cellules cibles résistantes à la lyse NK (exprimant de forts niveaux de CMH-I) et sensible (CMH-I négatives). Les cellules NKT restreintes par CD1d n'étant pas réputées pour leur cytotoxicité, ces résultats confirmaient que nous n'étions pas en présence de ce type de cellules régulatrices. Outre leur forte capacité cytotoxique, les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> étaient majoritairement CD8<sup>+</sup>, contrairement aux cellules NKT restreintes par CD1d qui sont soit CD4<sup>+</sup> ou double négatives (323). De plus, les colorations des cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> par un anticorps dirigé contre la chaîne V $\alpha$ 24 du TCR humain exprimé par les NKT classiques ou avec des tétramères de CD1d présentant l'antigène  $\alpha$ -GalCer ont confirmé que ces cellules n'étaient pas des cellules NKT classiques.

La caractérisation phénotypique des cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> a révélé que celles-ci étaient CD161 et CD244 positives, deux marqueurs exprimés par les cellules NK et NKT (324). Le pouvoir cytotoxique des cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> pourrait donc être lié à la présence de ces marqueurs, puisqu'il a été démontré chez le rat que CD161 avait un rôle activateur dans la cytotoxicité des cellules NK (193, 325). Pour sa part, CD244 est un membre de la famille CD2 qui peut servir de co-stimulateur et augmenter la lyse indépendante du CMH grâce à son association à LAT. Le ligand de CD244 est CD48, une molécule exprimée par la plupart des cellules T et il a été démontré que l'interaction intercellulaire par ces récepteurs peut induire une stimulation indépendamment de la présence d'APC (178). Bien qu'au moment de soumettre l'article, nous avons déjà caractérisé l'expression de CD94 par les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, nous avons omis ce résultat

qui a servi dans le 3<sup>e</sup> article. Mais la présence de protéines CD94/NKG2 à la surface de ces cellules NKT-like suggère la possibilité d'une autre voie d'activation qui pourrait expliquer leur forte capacité cytotoxique. Finalement, on peut noter que 25 % des cellules T exprimant CD56 étaient positives pour au moins un KIR inhibiteur et se classaient donc comme étant des cellules Tm1 (146).

La grande variabilité du pourcentage de cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> chez un même donneur à des temps différents suggère que la prolifération de ces cellules est affectée par des facteurs environnementaux. D'ailleurs, l'acquisition de CD56 et CD161 par les cellules T suggère que ces lymphocytes ont été stimulés auparavant puisqu'il a été démontré que les infections virales pouvaient augmenter la quantité de cellules NKT-like chez l'homme et la souris (282, 285, 326). Le marqueur de cellule T mémoire CD45RO était exprimé par environ 50 à 70 % des cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, suggérant que les marqueurs de cellules NK sont acquis avant la différenciation de la cellule naïve (CD45RO<sup>-</sup>) en cellule mémoire (CD45RO<sup>+</sup>) bien qu'il soit possible que les NKT-like CD45RO<sup>+</sup> et CD45RA<sup>+</sup> soient deux lignées différentes. Lorsque nous avons comparé le pouvoir chimiotactique des deux sous-populations, seules les cellules NKT-like CD45RO<sup>+</sup> pouvaient recruter les diverses populations de cellules du système immunitaire inné.

Considérant le rôle important joué par FasL dans notre modèle, nous avons évalué la sensibilité des cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> à l'apoptose suite à l'engagement de Fas. Les doses de FasL induisant la sécrétion maximale de chimiokines par les cellules NKT-like n'induisent aucune apoptose chez ces dernières. De plus, à des doses supérieures de FasL, on observe une survie préférentielle des cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> par rapport aux cellules T CD8<sup>+</sup>naïves et ce malgré le fait que les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> expriment de plus forts niveaux de Fas que les cellules T naïves (327). Cette résistance à l'apoptose pourrait être liée au fait que les cellules T mémoires (CD45RO<sup>+</sup>) expriment des niveaux supérieurs des protéines anti-apoptotiques survivine (258) et Bcl-2 (259). L'expression de NKR pourrait aussi contribuer à une résistance accrue à

l'apoptose puisque, par exemple, la stimulation de CD244 active la cellule et induit une signalisation anti-apoptotique passant par la voie de Akt (216).

Alors que dans plusieurs modèles expérimentaux l'apoptose mène à la libération de chimiokines (101, 328), nous démontrons que les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ne sont pas en apoptose lors de cette sécrétion. Par contre, l'utilisation d'un inhibiteur de la caspase-8 réduit significativement la migration des neutrophiles vers les cellules NKT-like CD56<sup>+</sup>, alors qu'un inhibiteur de caspase-1, impliqué dans l'activation de la pro-IL-1 $\beta$ , n'a aucun effet (42). Ceci indique que la sécrétion de chimiokines par des cellules NKT-like dépend de l'activité de la caspase-8 mais ne requiert pas l'apoptose de la cellule, ce qui représente un nouvel exemple de signalisation non-apoptotique via Fas. Le mécanisme intracellulaire responsable reste à déterminer. FLIP-L est une protéine intracellulaire anti-apoptotique de courte demi-vie qui s'associe au DISC de façon compétitive à la caspase-8, mais FLIP peut aussi activer les voies ERK et NF- $\kappa$ B (329) dont l'activité contribue à la sécrétion de cytokines et de chimiokines dans plusieurs modèles d'inflammation (330). L'activation des voies JNK par ASK1-DAXX a été démontrée suite à la liaison de Fas (331). Finalement, l'inhibition des caspases chez des cellules T traitées avec FasL bloque l'apoptose et révèle la production de cytokines pro-inflammatoires via l'activation des voies ERK et NF- $\kappa$ B (105). Il a été démontré qu'il peut y avoir de l'activité caspase lors de l'activation des cellules T en absence d'apoptose (107, 108). Alors que la plupart des cellules T CD8<sup>+</sup> seront éliminées lorsqu'elles entrent en contact avec des cellules exprimant FasL, les cellules NKT-like CD56<sup>+</sup>, ayant une résistance à l'apoptose élevée, vont plutôt sécréter des chimiokines inflammatoires. Bien que cette sécrétion passe probablement par le clivage spécifique de substrats de la caspase-8, la mort de la cellule par apoptose n'est pas requise.

Après avoir établi que les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> libéraient des agents chimiotactiques lorsque stimulées par FasL, nous avons étudié les molécules

chimiotactiques qui pourraient être impliquées. L'inhibition des voies de la cyclooxygénase et de la lipooxygénase n'ayant pas empêché le recrutement de neutrophiles, nous avons éliminé le rôle possible des médiateurs lipidiques. La détermination des protéines présentes dans les surnageants suite à l'engagement de Fas a permis d'identifier une dizaine de chimiokines fortement induites : CCL1, CCL5, CCL7, CCL8, CCL17, CCL27, CXCL1, 2, 3, CXCL8, CXCL11 et CXCL12. La plupart de ses chimiokines sont connues pour pouvoir recruter au moins une sous-population de leucocytes du système immunitaire inné, les neutrophiles (CXCL1, 2, 3, CXCL8 et CCL5) les cellules NK (CCL1, CCL5, CCL7, CCL8, CXCL1, 2, 3, CXCL8, CXCL11 et CXCL12) et les monocytes (CCL5, CCL7, CCL8 et CXCL12). Parmi ces chimiokines, CCL5 et CXCL8 sont d'excellents candidats dans notre modèle expérimental puisqu'elles ont le pouvoir de recruter les 3 sous-populations de cellules du système immunitaire inné et sont fortement induites suite à un traitement avec FasL.

CCL5 pourrait être particulièrement importante puisqu'il a été démontré que les cellules T mémoires possèdent des granules uniques contenant cette chimiokine qui peuvent être rapidement libérés (332). De fait, les chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5 sont pré-formées dans les cellules T mémoires et peuvent être sécrétées dans les 60 min suivant une stimulation (333). Il a par ailleurs été démontré que l'expression de CCL5 par des cellules tumorales peut causer une infiltration massive de leucocytes et un ralentissement de la croissance de ces tumeurs (334). Finalement, des résultats récemment parus démontrent clairement que les cellules T auto-réactives  $CD8\alpha\alpha^+$  exprimant de forts niveaux de CD161 expriment 20 fois plus de CCL5 que les cellules T  $CD8\alpha\beta^+$  (297). Nous avons observé que l'utilisation d'un inhibiteur du transport de Golgi n'empêchait pas la sécrétion des chimiokines actives envers les neutrophiles, ce qui milite en faveur de l'hypothèse que les cellules  $CD3^+CD56^+$  contiennent certaines chimiokines pré-formées et entreposées dans des compartiments vacuolaires.

Plusieurs hypothèses ont été avancées quant au rôle de ces cellules NKT-like. Malgré leur faible nombre dans la circulation sanguine, les cellules

CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> pourraient être une sous-population spécialisée de lymphocytes ayant un rôle important dans l'immunosurveillance des cancers grâce à leur pouvoir cytotoxique important et à leur capacité unique de recruter rapidement d'autres leucocytes. Les cellules NKT-like sont probablement des cellules T mémoires ayant acquis des NKR lors de leur maturation (214). Par exemple, la prolifération spécifique de cellules NKT-like chez des patients atteints du VIH a été démontrée dans plusieurs études (335, 336). Les niveaux de FasL augmentent chez les cellules infectées par le VIH (337) et les cellules T CD8<sup>+</sup> sont essentielles au contrôle de la réplication du virus (338), donc les cellules NKT-like CD8<sup>+</sup> stimulées par la présence de FasL pourraient contribuer à combattre l'infection virale directement ou indirectement.

Les cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> pourraient donc jouer un rôle important dans la défense anti-virale et anti-tumorale. L'activation de ces cellules et le recrutement subséquent de neutrophiles, cellules NK et monocytes permettraient la destruction de cellules infectées ou tumorales par les deux premiers et les cellules NKT-like, puis l'acquisition d'antigènes par les monocytes permettrait l'entrée en jeu de l'immunité acquise.

## Section II : Discussion de l'article II

L'importance grandissante accordée aux cellules T NKR<sup>+</sup> dans la tolérance périphérique et la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales incite à une meilleure caractérisation de ces lymphocytes. Dans un article intitulé « Deux populations fonctionnellement distinctes de cellules T mémoires exprimant des marqueurs de cellules natural killer sont différenciées par leur expression de CD3 et CD94. », nous avons démontré que les lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> exprimant le marqueur de cellules T mémoires CD45RO se divisent en 2 groupes basés sur l'expression de CD94 et de CD3. Dans le premier article (chapitre II) nous avons démontré qu'une sous-population de cellules T mémoires CD8<sup>+</sup> exprimant CD56 ainsi que plusieurs autres NKR étaient fortement cytotoxiques envers des cellules cibles, sensibles ou résistantes aux cellules NK. Cette population avait la capacité de recruter les cellules du système immunitaire inné (cellules NK, monocytes et neutrophiles) par la sécrétion de chimiokines suite à l'engagement de Fas. L'acquisition de NKR par les cellules T mémoires permet un contrôle efficace de leurs fonctions et l'expression de CD56 est en corrélation avec une cytotoxicité accrue (183). CD244 est inductible sur les cellules T CD8<sup>+</sup> (176) et l'interaction CD244-CD48 permet d'augmenter la réponse des cellules T exprimant CD48 et la co-stimulation pour les CD244<sup>+</sup> (175). L'expression de NKR sur les cellules T mémoires peut avoir des effets bénéfiques, mais pourrait être désastreuse si les cellules sont des clones auto-réactifs.

Les cellules T mémoires CD56<sup>+</sup> marquées par un anticorps dirigé contre CD3 se divisent en deux groupes selon le niveau de CD3 exprimé; le niveau le plus élevé étant 2.5 fois plus intense. Cette séparation CD3<sup>élevé</sup>/CD3<sup>bas</sup> est déjà connue et est caractéristique de populations mineures de lymphocytes T comme les NKT classiques (219), les cellules T  $\gamma/\delta$  (355), les cellules T extra-thymiques (356), les NT (357) et les cellules T auto-réactives (358). La différence de niveau de CD3 pourrait jouer un rôle dans la réponse fonctionnelle des cellules puisqu'il

a été démontré qu'après une stimulation via le TCR, il y a diminution de la quantité de TCR à la surface de la cellule ce qui augmente le seuil d'activation requis pour une re-stimulation (359). CD3 permettrait donc de différencier deux populations de cellules NKT-like CD56<sup>+</sup>. L'évaluation de l'expression de divers NKR a révélé une forte corrélation entre l'expression élevée de CD3 et la présence de CD94, suggérant une fois de plus qu'il existe au moins deux groupes fonctionnels parmi les cellules T mémoires CD56<sup>+</sup>.

La protéine CD94 forme des hétérodimères avec les membres de la famille NKG2, devenant récepteurs inhibiteurs (NKG2A et B) ou activateurs (NKG2C, E, F et H) (201). L'expression des récepteurs inhibiteurs par des cellules T CD8<sup>+</sup> est associée à une résistance accrue à l'apoptose (360). L'hétérodimère CD94/NKG2 interagit avec le CMH-I HLA-E qui présente des peptides dérivés des séquences peptide-signal des HLA-A, B et C permettant ainsi à CD94/NKG2 d'évaluer le niveau global de CMH-I exprimé (361). La présence de récepteurs CD94/NKG2 inhibiteurs sur une sous-population de cellules T mémoires permet un meilleur contrôle des fonctions de ces cellules et suggère que celles-ci seraient dangereuses pour l'hôte si non-contrôlées. Pour évaluer les fonctions des deux sous-populations de cellules NKT-like CD56<sup>+</sup>, nous avons testé leur potentiel chimiotactique, cytotoxique et prolifératif.

Les deux sous-populations avaient des capacités similaires de recrutement des cellules du système immunitaire inné après l'engagement de Fas. Donc le potentiel pro-inflammatoire des cellules T mémoires CD56<sup>+</sup> n'est pas confiné à une seule sous-population. Par contre, le test du potentiel cytotoxique a démontré que les cellules CD94<sup>+</sup> sont 3 fois plus efficace que les cellules CD94<sup>-</sup> pour l'élimination de cellules cibles résistantes à l'action cytotoxique des cellules NK. De plus, l'évaluation du contenu en perforine a révélé que les cellules CD94<sup>+</sup> en contiennent 5 fois plus que les cellules CD94<sup>-</sup>, une observation en accord avec les résultats obtenus dans les tests de cytotoxicité. Ces résultats confirment qu'il y a bien deux populations fonctionnellement distinctes de cellules T mémoires CD56<sup>+</sup>.

Des tests de prolifération par stimulation CD3-CD28 ont démontré que les cellules CD94<sup>-</sup> étaient significativement hypo-répondantes en comparaison aux CD94<sup>+</sup> qui répondaient de manière similaire à des cellules T CD8<sup>+</sup> naïves. Puisqu'une prolifération équivalente des deux sous-populations est observée suite à une stimulation PMA-ionomycine, cela suggère que les cellules CD94<sup>-</sup> sont partiellement anergiques et ne peuvent pas proliférer même si une stimulation TCR supérieure est fournie. L'absence de CD94/NKG2 est donc associée aux cellules ayant une faible capacité proliférative.

L'analyse semi-quantitative de l'expression en ARNm des NKG2 par les sous-populations CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> a révélé que NKG2A, C et E était exprimé plus fortement par les cellules CD94<sup>+</sup>. Par contre l'expression de l'ARNm de NKG2D, F ainsi que de CD94 était similaire. L'expression en surface de la molécule CD94 requiert un partenaire NKG2 et il a été démontré que la détection d'ARNm de NKG2A est en corrélation avec la présence de la protéine. De plus, une hiérarchie existe parmi les NKG2 : par exemple l'expression de NKG2A prime sur NKG2C lorsque les deux ARNm sont détectés (207). Cela suggère que la population de cellules T mémoires CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> exprimeraient au moins l'hétérodimère CD94/NKG2A. De plus, d'autres études sur des clones individuels ont suggéré que CD94/NKG2C serait exprimé par les cellules CD8<sup>+</sup> effectrices et CD94/NKG2A par les cellules T mémoires (207). Le rôle inhibiteur de NKG2A et sa prédominance suggère donc que la cytotoxicité accrue des cellules CD94<sup>+</sup> par rapport aux CD94<sup>-</sup> n'est pas due à la présence de CD94/NKG2 activateurs, mais on ne peut pas exclure que certaines cellules T mémoires CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> puissent exprimer NKG2C ou E et il serait intéressant de confirmer le phénotype NKG2 de cellules individuelles formant la population CD94<sup>+</sup>.

L'abondance relative de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> a été évaluée chez un groupe de jeunes adultes et a révélé une variabilité temporelle au sein des mêmes donneurs, suggérant que des facteurs environnementaux contribuent à

la modulation de cette population. Il a par ailleurs été démontré que, par exemple, la détresse psychologique augmentait le nombre de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (362). Alors que les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> sont virtuellement absentes dans le sang du cordon ombilical, la stimulation de cellules T CD8<sup>+</sup> par l'IL-15 induit l'expression de CD56 mais pas de CD161 ou CD94 et induit aussi leur prolifération (310). L'analyse de la proportion de cellules T mémoires CD56<sup>+</sup> en fonction de l'âge (20 à 60 ans) démontre une corrélation négative biphasique qui met en évidence la disparition quasi complète de la sous-population de CD94<sup>+</sup>perforine<sup>élevé</sup> passé l'âge de 40 ans. Une corrélation négative entre l'âge et le contenu en perforine de cellules T CD8<sup>+</sup> a déjà été démontrée (363) ce qui supporte les résultats de notre article.

Contrairement à la croyance populaire, l'expression de la plupart des NKR n'est pas corrélée positivement à l'âge. Exception faite de CD57 (312) et des KIR (146) qui augmentent avec l'âge, l'expression de la plupart des NKR (9 étudiés) sur les lymphocytes T mémoires baisse légèrement ou est sans relation avec l'âge (288). L'expression de CD94 est modulée par divers stimuli permettant une grande variation dans le pourcentage de cellules positives à un moment donné (Figure 5A). Par contre même si le taux de cellules KIR<sup>+</sup> augmente avec l'âge, l'expression de KIR sur les lymphocytes T serait pré-déterminée plutôt qu'induite dans le temps (147). Ceci suggère que les cellules T qui deviendront KIR<sup>+</sup> possèderaient un avantage de survie qui leur permettraient de devenir pré-dominantes avec l'âge. En effet la présence de KIR réduit la sensibilité à l'AICD chez les cellules T humaines (364) et mène à l'accumulation de cellules T mémoires CD8<sup>+</sup> chez la souris (216).

Quelques études ont rapporté une augmentation de la proportion de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> avec l'âge (308, 312, 365, 366). Dans deux études comparant les 50 ans à des centenaires en santé, Miyaji et al. ne voyaient pas de différences significatives dans le taux de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> entre les deux groupes d'âges, mais une tendance positive était observée (308, 312). Sansoni et al. ont comparé les pourcentages de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> chez 138 sujets (4 à

106 ans) incluant 26 centenaires. Ils démontrent une augmentation de la population CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> avec l'âge (365), mais si on exclut les moins de 18 ans puisqu'il est connu qu'à la naissance les cellules NKT sont absentes (310, 367), on élimine la corrélation positive. De plus, si on enlève du graphique les plus de 80 ans pour permettre une comparaison directe avec nos résultats, on observe une corrélation négative similaire à celle observée dans la Figure 5B de notre article.

McNerlan et al. ont étudié 229 sujets âgés entre 18 et 99 ans pour démontrer qu'il y a une corrélation positive entre l'âge et la proportion de cellules CD3<sup>+</sup>CD(16+56)<sup>+</sup> (366). La conclusion de cette étude ne peut pas être ignorée, mais l'utilisation par les auteurs d'une combinaison d'anticorps anti-CD16 + anti-CD56 définit une population de cellules T moins spécifique que la population CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> que nous avons étudiée puisque CD16 est exprimé par plusieurs sous-populations telles les cellules T stimulées par IL-2 (368) et les cellules T  $\gamma/\delta$  (369). Exception faite de cette étude, on peut conclure que la corrélation négative que nous avons observée rejoint la majorité des observations rapportées à ce jour concernant l'expression de NKR, plus particulièrement CD56, sur les lymphocytes T. En résumé, après avoir atteint un sommet autour de l'âge de la puberté, la proportion de cellules T mémoires CD56<sup>+</sup> diminue d'une manière biphasique pour se stabiliser après 40 ans à des niveaux 5 fois inférieurs de ceux de la puberté. Les cellules CD94<sup>+</sup> ayant une forte capacité cytotoxique et une bonne réponse proliférative sont particulièrement touchées par cette baisse et cela se reflète probablement dans les réponses immunitaires chez les personnes âgées. L'augmentation graduelle de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> avant la puberté (370) suivie d'une baisse graphiquement biphasique est réminiscente de la réduction d'émigrants thymiques associée à l'âge (307), ce qui permet de suggérer que ces cellules seraient peut-être fortement associées à l'environnement thymique.

Puisque les deux sous-populations exprimaient plusieurs marqueurs en commun leur relation ontogénique a été évaluée. Suite à une stimulation via CD3 et CD28 plus de 50 % des cellules CD94<sup>+</sup> perdent l'expression de CD94 et démontre une baisse des niveaux de perforine. La perte de CD94 est associée à une baisse d'ARNm de NKG2A, C et E, confirmant ainsi la nécessité des partenaires NKG2 pour l'expression en surface de CD94. Par contre, une stimulation par l'IL-15 induit une augmentation des niveaux de perforine chez les deux sous-populations, ce qui est en accord avec les données publiées (371), et aussi induit l'expression de CD94 sur certaines cellules CD94<sup>-</sup>. Donc *in vivo* la stimulation antigénique induirait la prolifération préférentielle des cellules CD94<sup>+</sup> et leur différenciation subséquente en cellules CD94<sup>-</sup> alors que la stimulation par IL-15 permettrait la prolifération des deux sous-populations et augmenterait leur capacité cytotoxique.

Malgré le fait que la population de cellules T mémoires NKR<sup>+</sup> ne représente qu'une petite proportion des PBMC, elles pourraient contribuer à la surveillance immunitaire contre les tumeurs dû entre autres à leur habileté à éliminer des cellules cibles qui sont ou non sensibles à l'activité cytotoxique des cellules NK. Ces cellules NKR<sup>+</sup> pourraient aussi jouer un rôle important dans l'inflammation puisqu'elles ont la capacité de recruter des cellules du système immunitaire inné. Des variations dans la quantité ou la fonction de ces cellules pourraient donc être associées à certaines pathologies et il sera intéressant d'évaluer le nombre et les fonctions de ces cellules chez des patients souffrant de maladies auto-immunes ou de cancers.

## CHAPITRE 6 CONCLUSION

---

La majorité des publications traitant des cellules NKT concernent celles qui sont restreintes par CD1d. Il est en effet difficile de trouver des données sur les cellules CD3<sup>+</sup>NKR<sup>+</sup> puisqu'elles comprennent plusieurs groupes possédant des caractéristiques phénotypiques différentes et que pour les distinguer des cellules NKT exprimant une chaîne invariante de TCR $\alpha$ , la plupart des auteurs leur donnent un nom plus descriptif, comme par exemple NKR<sup>+</sup> T cells, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, T mémoires exprimant des récepteurs NK ou encore NK T ou NT. Dans ces conditions, la recherche d'articles pertinents devient ardue. Par contre, depuis un an on réalise que les diverses sous-populations des cellules T $\alpha/\beta$  possédant des caractéristiques NK pourraient en fait se résumer à seulement un ou deux groupes distincts. Il a été démontré que toutes les cellules IEL T $\alpha/\beta$  sont d'origine thymique (372). Lors de la sélection positive des cellules T ayant un TCR auto-réactif, ces cellules vont réduire leur expression de CD8 $\beta$  pour ainsi augmenter le niveau d'activation requis tout en évitant l'élimination. Ces cellules vont migrer préférentiellement dans l'épithélium intestinal, notamment à cause de l'expression locale de TL qui possède une affinité supérieure pour CD8 $\alpha\alpha$  comparé à CD8 $\alpha\beta$  (296). De plus, ces cellules CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> expriment plusieurs marqueurs phénotypiques et possèdent plusieurs caractéristiques fonctionnelles des cellules NK (297). Il semble donc que certaines cellules IELs et les cellules CD8 $\alpha\alpha$  auto-réactives identifiées par divers groupes, représentent une seule et même population de cellules NKT-like (373).

Compte tenu des données disponibles, on peut suggérer que les cellules TCR<sup>+</sup> NKR<sup>+</sup> sont divisées en deux grandes populations : les cellules NKT-like innées, qui possèdent leurs marqueurs NK dès leur formation, et les cellules NKT-like acquises qui apparaissent suivant l'activation et la différenciation de cellules T mémoires. Comme toutes les cellules T activées, les cellules T mémoires NKR<sup>+</sup> vont transiter par le foie où elles vont s'accumuler dû entre

autres à leur résistance à l'apoptose. Les cellules NKT-like innées quant à elles acquièrent l'expression de NKR très tôt dans leur développement. La majorité de ces cellules expriment l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ , elles sont potentiellement auto-réactives et semblent se loger préférentiellement dans l'épithélium intestinal. Les cellules NKT-like présentes dans le sang sont probablement composées d'un mélange de ces deux groupes. L'identification des récepteurs d'adhésion et des récepteurs de chimiokines qu'elles expriment pourrait permettre de confirmer le "homing" différentiel de ces deux sous-populations et par conséquent pourrait représenter un moyen de différencier les NKT-like innées des NKT-like acquis.

Les cellules NKT classiques définies chez l'humain par l'expression de la chaîne V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 et par celle de V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 chez la souris et réagissant à la liaison par CD1d- $\alpha$ GalCer, diffèrent fonctionnellement des cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> (non-restreintes par CD1d), par leur rôle de cellules T régulatrices qui se traduit par une sécrétion massive d'IL-4, GM-CSF, IL-13 et IFN- $\gamma$  lors de leur stimulation; alors que les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ont surtout été caractérisées par leur grande capacité cytotoxique (297). On peut donc conclure que les cellules NKT classiques et les cellules NKT-like sont d'origine différente et possèdent des rôles distincts dans le système immunitaire, et par conséquent une attention particulière doit être portée à la nature des cellules traitées dans les différents articles.

Si l'on fait une synthèse de la classification NKT pour y inclure les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> que nous avons identifiées, celles-ci semblent clairement faire partie des cellules T mémoires qui acquièrent leurs NKR<sup>+</sup> par stimulation (254). Les cellules NKT CD56<sup>+</sup> possèdent le même phénotype et les mêmes fonctions que les cellules NT (262) et pourraient donc en faire partie, mais les études proviennent en majorité de cellules intra-hépatiques murines. On ne peut cependant pas classer ces cellules dans le groupe des Tm1 (255) puisque les récepteurs CD94/NKG2 inhibiteurs n'ont pas été formellement identifiés à la surface des cellules et nous n'avons pas eu le loisir de regarder l'expression des KIR et LIR. Par contre, selon la convention suggérée par Godfrey et al. (254), et

utilisée au cours de cette thèse, les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> feraient partie du groupe des cellules NKT-like (non restreintes par CD1d et CD161<sup>+</sup>). Alors que tous s'accordent pour dire que les NKT-like ont une résistance accrue à l'apoptose, nos données démontrent une fonction pro-inflammatoire de la stimulation par Fas par la sécrétion de chimiokines, particulièrement de RANTES (CCL5). Cette dernière est aussi sécrétée de façon caractéristique par les cellules T mémoires (374) et les NKT classiques (375). Finalement, aucun des termes NKT n'a été mis en corrélation avec l'âge et par conséquent nos données à ce sujet sont uniques.

Nos résultats ont clairement identifié plusieurs différences entre les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> que nous avons caractérisées et les cellules NKT classiques, notamment leur plus grande capacité cytotoxique, leur TCR varié et leur non spécificité envers CD1d- $\alpha$ GalCer. La résistance des NKT-like CD56<sup>+</sup> à l'apoptose initiée par FasL et la sécrétion subséquente de chimiokines suggèrent que ces cellules sont résistantes à l'AICD et peuvent infiltrer les sites immunoprivilégiés et tumoraux exprimant FasL. La sécrétion de chimiokines suite à la stimulation de Fas est probablement biaisée par d'autres facteurs telle la présence de certaines cytokines, ce qui permettrait aux NKT-like CD56<sup>+</sup> de ne pas être activées dans les sites immunoprivilégiés, d'attirer préférentiellement les monocytes lors de l'AICD et d'attirer les cellules NK et PMN lorsqu'en présence de cellules tumorales. En présence de cellules anormales, des NKT-like mettent vraisemblablement à profit leur grande capacité cytotoxique dépendante de l'activation par NKR pour les éliminer. Par contre, une activation non-spécifique de ces cellules pourrait mener à des dommages importants et par conséquent pour assurer un meilleur contrôle, l'activation continue par le TCR de ces cellules mènerait à leur différenciation en cellules hypo-répondantes et possédant une plus faible capacité cytotoxique. Finalement, le nombre de cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> diminue avec l'âge. Cette baisse pourrait en partie expliquer plusieurs phénomènes cliniques associés à un âge avancé comme par exemple le plus grand risque de cancers et de maladies auto-immunes. Ce qui nous amène à nous demander quel pourrait bien être le/les rôles de ces cellules *in vivo*.

Puisqu'une partie importante des cellules NKT non restreintes par CD1d semblent en fait provenir de cellules T mémoires ayant acquis des marqueurs NK, il est logique de penser que les cellules NKT-like auraient un rôle important à jouer dans les infections dont la résolution fait appel au système immunitaire adaptatif. En effet la présence de cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> a été démontrée dans plusieurs infections virales (VIH (205), influenza (285), LCMV (290)) mais aussi parasitaires (*Trypanosoma* (376), *plasmodium* (377)). Il est cependant important de réaliser que ces infections ne mènent pas au recrutement de cellules NKT-like, mais au contraire induisent l'expression de NKR sur les cellules T ayant été stimulées par celles-ci. Cette induction permet fort probablement de mieux contrôler l'activation de la cellule et ainsi d'éviter la stimulation non-spécifique qui pourrait mener à l'auto-réactivité.

L'une des caractéristiques importantes de cellules T mémoire CD56<sup>+</sup>, que nous et d'autres laboratoires avons démontrées, est leur très grande résistance à l'apoptose induite par l'engagement de Fas et par conséquent à l'AICD, qui permet la survie à long terme de ces cellules et leur accumulation dans des organes comme le foie. Il est donc évident que ces cellules sont d'une très grande importance pour le système immunitaire et qu'elles sont capables d'autres fonctions. Comme toutes les cellules mémoires, elles sont probablement capables d'être réactivées de façon spécifique à l'antigène pour ainsi résoudre rapidement une 2<sup>e</sup> infection. Mais la présence stable de plusieurs NKR suggère aussi d'autres fonctions nécessitant une reconnaissance rapide pour une réponse de type inné.

Le premier rôle hypothétique qui nous semble évident est la fonction anti-tumorale de ces cellules en raison de leur expression de plusieurs marqueurs des cellules NK. La comparaison des populations de cellules NKT-like (CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) dans la moelle osseuse d'individus sains ou de patients en rémission de tumeurs malignes hématopoïétiques a permis d'observer chez ces derniers une augmentation significative de ces cellules (378). De plus une

présence accrue de NKT-like NK1.1<sup>+</sup> chez la souris est liée à une protection contre le cancer du foie (379).

Les cellules identifiées par la co-expression de marqueurs du système immunitaire inné et adaptatif (cellules  $\gamma\delta$ , NKT et B1) possèdent souvent des niveaux supérieurs de reconnaissance du soi et c'est pourquoi plusieurs chercheurs ont suggéré un rôle important pour les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> dans l'auto-immunité, même si pour l'instant peu de preuves directes existent (380). Il est encore incertain si la présence de ces cellules a un rôle protecteur ou initiateur de la maladie. Par exemple, plusieurs modèles murins de maladies auto-immunes, tel le diabète (244) et la sclérose en plaque (381), ont permis d'établir une corrélation entre la maladie et une réduction du nombre et de l'activité de cellules NKT-like. D'autre part, il a été démontré que des cellules NKT-like hautement cytotoxiques pouvaient initier certaines maladies auto-immunitaires (209), ce qui pourrait signifier un déséquilibre entre les ligands de NKR inhibiteurs et ceux de NKR activateurs. Comme plusieurs des NKR reconnaissent des protéines du soi (CMH-I ou autre), on conçoit aisément que le stress ou l'infection d'une cellule va affecter son profil d'expression et mener à son élimination par des cellules NK ou NKT-like. Dans certains cas, des cellules NKT-like activées pourraient être sur-stimulées par la reconnaissance d'antigènes du soi et cela mènerait à l'attaque de l'organe et donc à l'auto-immunité.

Prenons l'exemple du diabète : même si des études ont suggéré un rôle protecteur des cellules NKT-like (244, 382), plusieurs autres suggèrent plutôt le contraire. Chez la souris NOD, il a été démontré que le développement de la maladie requérait l'infiltration de l'organe par des cellules T CD8<sup>+</sup> (383) et que parmi celles-ci plusieurs clones étaient auto-réactifs. Ces cellules auto-réactives vont augmenter leur avidité pour les antigènes du soi par une maturation du TCR durant la progression de la maladie (384) et sont nécessaires autant pour la phase initiale que la phase finale du diabète (385). Les cellules CD8<sup>+</sup> infiltrant le pancréas ont été caractérisées comme étant des cellules T mémoires NKG2D<sup>+</sup> induisant la migration secondaire de cellules NK (la migration des neutrophiles et

des monocytes ne semble pas avoir été vérifiée). La neutralisation *in vivo* par des anticorps anti-NKG2D inhibe l'infiltration des cellules T CD8<sup>+</sup> dans le pancréas et empêche l'apparition des symptômes diabétiques chez les souris (386). Finalement, il a été démontré qu'un fort pourcentage de cellules T CD8<sup>+</sup> auto-réactives infiltrant le pancréas exprimaient CD56 et cette expression était en corrélation avec une forte cytotoxicité envers les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas (209).

Les cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> pourraient représenter le lien entre l'immunité acquise et innée et il est intéressant de réaliser que la cascade inflammatoire initiée par ces cellules est inversée : ces cellules immunitaires "acquises" activent et recrutent les cellules immunitaires innées qui elles vont exécuter la réponse inflammatoire. Par exemple, les trophoblastes utérins expriment FasL et ainsi le site d'implantation de l'embryon est immunoprivilégié : les cellules T maternelles reconnaissant des antigènes paternels sont éliminées avant de pouvoir rejeter le fœtus (387). Lors de pré-éclampsies les niveaux d'expression de FasL sont augmentés et on observe une accumulation de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, de neutrophiles et de cellules NK à l'interface utéro-fœtale (388). En condition pathologique, il est possible que les cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> soient activées par l'expression de FasL sur les trophoblastes menant ainsi à l'attraction de cellules du système immunitaire inné qui attaquent l'interface utéro-fœtale pour rejeter l'embryon.

Dû à la grande capacité cytotoxique et inflammatoire que possèdent les NKT-like, il serait important de prendre cette sous-population en considération lors des thérapies. L'immunothérapie du cancer par transfert adoptif de cellules T spécifiques pour la tumeur est l'une des nouvelles techniques prometteuses permettant une régression tumorale. Il a été démontré que l'injection d'IL-15 pour augmenter le temps de survie des cellules T transférées est très efficace (389). Mais ces études ne se sont pas attardées sur les conséquences de l'utilisation d'IL-15 qui provoque l'apparition de récepteurs NKR sur une grande majorité de

cellules T mémoires (158, 279, 282, 283) et qui stimule la prolifération préférentielle des cellules NKT-like CD56<sup>+</sup>. Ceci pourrait altérer grandement la réponse tumorale.

Le transfert adoptif de CIK pourrait aussi permettre de combattre de nombreux cancers et plusieurs laboratoires tentent de rendre les CIK résistantes à la chimiothérapie pour ainsi pouvoir utiliser les deux en combinaison (390). Des co-cultures de CIK avec des APC présentant des antigènes spécifiquement exprimés sur les cellules tumorales ciblées permettent d'augmenter la lyse spécifique de tumeurs (391). L'utilisation d'une lignée de cellules NKT-like (TALL-104) ayant plusieurs caractéristiques des CIK pour le transfert adoptif chez l'homme a déjà franchi l'étude clinique de phase I (392). Il apparaît donc nécessaire de mieux définir les fonctions pro-inflammatoires des cellules NKT-like.

Il est donc aisé de comprendre l'importance d'une meilleure caractérisation des cellules NKT-like CD56<sup>+</sup>. L'identification de l'ontogénie de ces cellules ainsi que de leurs stimuli prolifératifs et homéostatiques sera très importante pour la compréhension de leur rôle. La présence de plusieurs sous-populations de NKT-like n'est pas surprenante, mais leur lien ontogénique, démontré par la stimulation du TCR, devient très intéressant si l'on considère ces cellules NKT-like CD56<sup>+</sup> comme cellules T mémoires. Leur corrélation inverse avec l'âge soulève plusieurs questions, notamment celle de l'importance de ces cellules dans plusieurs maladies dont l'incidence augmente avec le vieillissement, comme les cancers et les maladies auto-immunitaires.

## CHAPITRE 7 REMERCIEMENTS

---

Est-il possible d'être concis ou d'être original pour ce dernier chapitre? Comment organiser les remerciements? Pour m'aider, j'ai consulté quelques ouvrages et cherché l'inspiration auprès de mes prédécesseurs. Ce que j'ai trouvé ne fut pas très rassurant : « *L'habileté à formuler les remerciements caractérise le spécialiste de haut vol* » a écrit l'Italien Umberto Eco (393). C'est pourquoi j'espère que cette section sera à la hauteur de la gratitude que je porte aux nombreuses personnes ayant contribué à cette thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur François Denis pour m'avoir accepté sous sa direction. Dès notre première rencontre, comprenant que mon expérience résidait dans la biologie cellulaire et non dans la biologie moléculaire, le Dr Denis a adapté le projet qu'il m'offrait pour qu'il soit dans mes cordes. Cette différence de spécialisation nous a pourtant permis d'aborder plusieurs problèmes avec des manières opposées de voir et au bout du compte cela a aidé au cheminement de ce projet de recherche.

La Science avance grandement par la pression de la compétition et nombre de carrières scientifiques sont principalement basées sur le nombre de publications, avec pour conséquence que plusieurs directeurs de recherche imposent les sujets et étouffent les étudiants par un encadrement trop rigoureux. Pourtant, le Dr Denis n'a pas suivi ces lignes et a laissé place à beaucoup d'essais fantaisistes de ma part tout en sachant me ramener dans la bonne voie. Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour ton intégrité et pour tes critiques, remarques et questions judicieuses, pour tout le temps consacré et ton enthousiasme envers le projet; et bien sûr pour ton amitié.

En second lieu j'aimerais remercier madame la présidente Suzanne Lemieux et les professeurs Ali Ahmad et Walid Mourad pour votre participation à mon comité d'évaluation et vos critiques constructives.

J'aimerais aussi remercier les professeurs Denis Girard et Claude Daniel pour votre aide, vos conseils et votre appui envers ce projet de recherche. Un merci tout spécial pour le Dr Nicolas Christou qui m'a initié à la recherche lors de mon « Honors BSc. » à l'Université McGill et qui a su allumer ma flamme de scientifique.

Il me faut aussi remercier la Fondation Armand-Frappier et le Fond de Recherche en Santé du Québec pour leur soutien financier qui est toujours très apprécié.

Je ne veux pas passer sous silence tous mes amis de l'Institut qui ont égaillé les journées sombres, rallongé certaines soirées et permis plusieurs heures de procrastination. Je veux entre autres mentionner ceux qui sont passés par le laboratoire : Louis, Sylvie, Geneviève et Véronique, mais aussi d'anciens et présents étudiants et amis proches... que je ne nommerai pas pour être sûr de ne pas oublier personne et froisser les âmes sensibles (vous vous connaissez).

Il y a aussi le laboratoire d'histocompatibilité : Fernando, Francine, Micheline, Denise, Monique, Claude (bis), Etienne, Caroline et Suzie : je vous remercie pour cet emploi enrichissant et valorisant que vous m'avez permis d'accomplir, et aussi pour votre appui et les diverses discussions que nous avons eues.

Finalement, un merci destiné à Marcel Desrosiers : sans ton aide en cytométrie, la frustration m'aurait probablement fait faire des choses que j'aurais regrettées; merci aussi à Chantal Cuggia qui m'a permis l'accès à une vaste liste de donneurs et à garder ma propre personne en santé.

À un niveau plus personnel, il est grand temps de terminer ces remerciements par ceux ayant eu un grand impact moral : ma famille. Merci à mes parents, Carmen et Yvon, pour votre soutien sans borne à chacune des étapes de cette longue scolarité. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir fait confiance en mes choix de carrières. Merci aussi à mon frère, Eric, pour son soutien, son écoute et pour son aide « de grand frère » dans tous les domaines où son expérience précède la mienne.

Toutes ses pages ne seraient rien sans le support, les encouragements et surtout l'amour de ma douce moitié, Manon, qui a affirmé devant tous vouloir partager ma vie. Depuis, nous formons une famille heureuse avec l'addition de deux petits bouts d'homme : Simon et Maxime, votre présence a suffi pour me remonter le moral et me pousser à me dépasser.

C'est ici que prend fin cette thèse. Le mot de la fin revient à l'un de mes philosophes préférés, Friedrich Nietzsche, qui a écrit à propos de la recherche, dans *Menschliches, allzumenschliches (Humain, trop humain)* (394) :

« Le pouvoir, non le savoir, exercé par la science.

*La valeur d'avoir passé quelque temps à pratiquer exactement une science exacte ne réside pas dans ses résultats ; car, en proportion de la mer des objets de science, ceux-ci ne sont qu'une quantité insignifiante. Mais on en tire un accroissement d'énergie, de capacité de raisonner, de constance à persévérer; on a appris à atteindre une fin par des moyens appropriés à cette fin. C'est en ce sens qu'il est très précieux, en vue de tout ce que l'on fera plus tard, d'avoir été un jour homme de science. »*

*Annexe A : 3<sup>e</sup> Article : Influence of Calcium Ions in the Flow  
Cytometric Analysis of Human CD8-positives Cells*

*Annexe B: Discussion du 3e article*

*Références*

## ANNEXE A.

### ARTICLE III : INFLUENCE OF CALCIUM IONS IN THE FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF HUMAN CD8-POSITIVE CELLS.

#### MISE EN CONTEXTE DU 3<sup>e</sup> ARTICLE

---

Alors que nous poursuivions nos recherches sur le rôle et la fonction des cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, nous avons remarqué que les cellules CD8<sup>+</sup> marquées par anti-CD8 étaient devenues difficiles à distinguer des cellules CD8<sup>-</sup> en cytométrie. Lors des expériences précédentes, cette coloration avait toujours donné 2 logarithmes (log) de différence entre cellules positives et négatives.

Nous nous sommes donc attardés à ce phénomène et avons identifié que cet effet provenait du tampon utilisé pour resuspendre les cellules lors de l'isolement par billes magnétiques MACS™. Il s'agit d'un tampon de phosphate salin, additionné de sérum de fœtus bovin et d'acide éthylène-diamine tétraacétique (EDTA). Lorsque les 3 constituants ont été testés individuellement, il est apparu que le phénomène était causé par la présence d'EDTA.

Même si cet article est issu du fruit du hasard, les résultats et conclusions n'en sont pas moins importants pour la communauté scientifique travaillant sur les cellules cytotoxiques humaines. Considérant l'importance de ces résultats, nous avons décidé de les intégrer à la thèse sous forme d'Annexe.

Après avoir identifié l'impact de l'EDTA pour la coloration de cellules CD8<sup>+</sup> par anti-CD8, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Déterminer si le phénomène est dû à l'internalisation de CD8.
- Déterminer si un masquage de l'épitope reconnu était dû à un changement de conformation cation-dépendant.
- Déterminer si ce phénomène est spécifique à l'anticorps anti-CD8 utilisé.

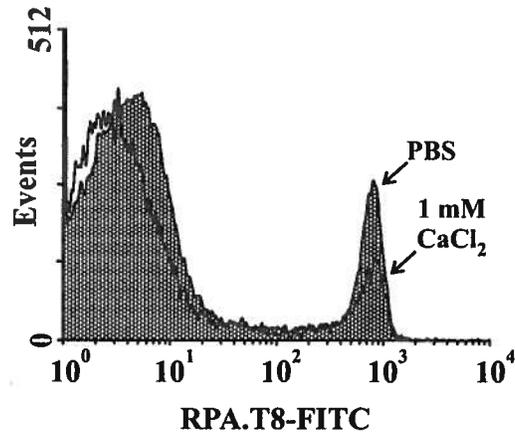
Influence des ions de calcium dans l'analyse par cytométrie en flux de cellules  
humaines COB+

Le co-récepteur COB est un marqueur important utilisé pour identifier plusieurs sous-populations de lymphocytes. Nous avons observé une baisse significative de la coloration cellulaire dirigée contre COBa en présence de chélateurs de cations divalents. La présence de chélateurs de calcium induit une baisse dose-dépendante dans l'intensité de fluorescence des cellules marquées par des anticorps monoclonaux anti-COBq humain. Ce phénomène n'était pas dû à l'internalisation du récepteur COB et peut être annulé par l'addition d'ions de calcium. Par contre, la chélation du calcium augmentait l'intensité de fluorescence des cellules marquées par un anticorps monoclonal anti-COB. Les chélateurs de cations divalents sont utilisés dans les suspensions cellulaires pour empêcher l'adhésion cellulaire. La communauté scientifique devait être prévenue que l'utilisation de ces chélateurs pourrait provoquer une baisse significative de la fluorescence en présence de certains anticorps monoclonaux anti-COBa. Puisque la coloration par COB est utilisée en parallèle avec la coloration aux tétramères de CMH-1 pour identifier les cellules T cytotoxiques antigène-spécifiques, l'effet de la chélation du calcium doit être pris en compte lors de ces expériences.

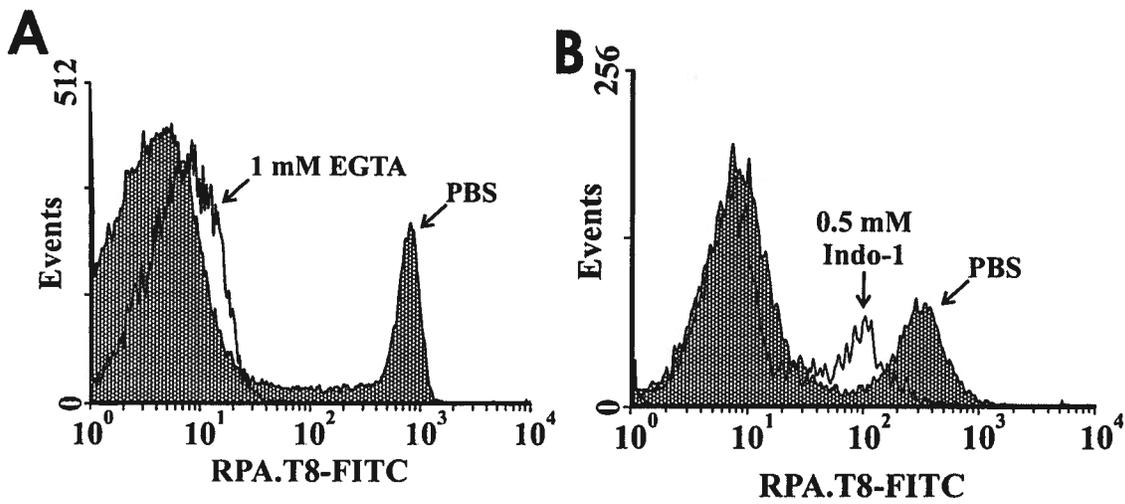
*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

Giroux M, Denis F. Influence of calcium ions in the flow cytometric analysis of human CD8-positive cells. *Cytometry A*. 2004 Nov;62(1):61-4  
DOI: 10.1002/cyto.a.20084

**SUPPLEMENTARY DATA NOT SHOWN**



**SD-F1: CaCl<sub>2</sub> treatment does not increase CD8 $\alpha$  staining.**  
PBMC were treated with 1mM CaCl<sub>2</sub> before stain with RPA.T8-FITC in the absence of EDTA pre-treatment. Compared to PBS treatment.



**SD-F2: Effect of EGTA and Indo-1 on CD8 $\alpha$  staining.**  
PBMC were pre-treated 10\_min with 1mM EGTA (A) or 0.5mM Indo-1 (B) before staining with anti-CD8 RPA.T8-FITC. Control is PBS.

**ANNEXE B.**  
**DISCUSSION DU 3<sup>E</sup> ARTICLE**

---

L'identification des cellules T CD8<sup>+</sup> est importante en immunologie clinique. Ces cellules représentent environ 30 % des lymphocytes circulant dans le sang de donneurs sains, mais ce pourcentage peut varier grandement lors d'infections ou autres maladies (339, 340). Les agents chélateurs tel l'EDTA sont fréquemment utilisés pour empêcher l'agglomération cellulaire et l'adhésion aux parois puisque les cations divalents sont nécessaires à l'action des molécules d'adhésion comme les intégrines. Dans un article intitulé : « *Influence des ions de calcium dans l'analyse par cytométrie en flux de cellules humaines CD8 positives* », nous démontrons que la présence de chélateurs de calcium réduit dramatiquement l'intensité de fluorescence de cellules humaines CD8<sup>+</sup> marquées avec des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre CD8. Cette baisse d'intensité est dose-dépendante, n'est pas due à l'internalisation du co-récepteur et peut être renversée par l'addition d'ions de calcium.

Plusieurs stimuli telle l'activation des cellules via le TCR mènent à l'internalisation de certains récepteurs. Afin de s'assurer que ceci n'était pas le cas dans la perte de fluorescence observée, la coloration cellulaire a été faite à 4 °C en présence d'azoture de sodium, ce qui empêche l'internalisation des récepteurs (341). Mais ce traitement n'a eu aucun effet sur la baisse de fluorescence causée par l'EDTA. La coloration de cellules perméabilisées a confirmé l'absence d'internalisation du co-récepteur. Finalement, le fait que seuls certains anticorps monoclonaux dirigés contre CD8 étaient affectés par la présence d'EDTA confirme notre hypothèse. Ces résultats établissent hors de tout doute que l'EDTA n'induit pas l'internalisation de CD8 et qu'un autre phénomène est impliqué.

En utilisant une double coloration avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CD8 $\alpha$  et CD8 $\alpha\beta$ , 3 populations de lymphocytes peuvent être identifiées : la majorité des cellules, dans le quadrant inférieur gauche, n'expriment pas CD8; environ 20 %, dans le quadrant supérieur droit, sont reconnues par les deux anticorps et expriment donc la forme CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, et une population mineure de

cellules (7 %), dans le quadrant inférieur droit, ne réagit qu'avec l'anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne  $\alpha$  et représente donc les cellules  $CD8\alpha\alpha^+$ . Parmi ces dernières, on compte des cellules NK, des cellules NKT et des IEL (316, 342). Un pré-traitement des lymphocytes à l'EDTA avant la coloration mène à la disparition de la population de cellules  $CD8\alpha\alpha$  qui se confond aux autres populations. Puisque le niveau d'intensité de la coloration par l'anticorps RPA.T8 des cellules  $CD8\alpha\alpha$  en absence d'EDTA est plus bas que sur les cellules  $CD8\alpha\beta$ , cela pourrait suggérer qu'en présence d'EDTA la représentation des cellules  $CD8\alpha\alpha$  est déplacée vers la gauche et se confond aux cellules doubles négatives. Alternativement, la représentation de la population de cellules  $CD8\alpha\alpha$  (7 %) pourrait s'être déplacée dans le quadrant supérieur droit où elle s'ajouterait aux 22 % de cellules  $CD8\alpha\beta$  pour former la population observée représentant 29 % des lymphocytes. De plus, la coloration plus intense avec l'anti- $CD8\alpha\beta$  en présence d'EDTA suggère que l'épitope reconnu devient plus accessible suite au traitement. La population de cellules  $CD8\alpha\alpha$  en présence d'EDTA pourrait donc représenter les cellules  $CD8\alpha\beta^{bas}$  ayant des caractéristiques similaires aux cellules  $CD8\alpha\alpha$  (278) et décrites par plusieurs chercheurs ayant utilisé le même anticorps monoclonal anti- $CD8\alpha\beta$  que dans notre article.

Il est important que les scientifiques qui effectuent des analyses par cytométrie vérifient l'influence des chélateurs d'ions et des anticorps utilisés. Nos résultats suggèrent que l'anticorps anti- $CD8\alpha\beta$  reconnaît un épitope présent sur la chaîne  $\alpha$  qui est masqué par la présence de la chaîne  $\beta$  et en présence de chélateurs de calcium ou de la chaîne  $\beta$ , la chaîne  $\alpha$  adopte une conformation différente qui permet la reconnaissance de cet épitope.

Il faudrait vérifier si un tel épitope dépendant de la présence de calcium est conservé entre les espèces, et particulièrement chez la souris. La possibilité que le calcium induise un changement de conformation aurait un impact sur notre compréhension du mécanisme fonctionnel du co-récepteur CD8. L'analyse de la structure longue (autour de 20 nm, plus de 2 fois la longueur du TCR) de CD8 démontre que ce récepteur se divise en deux parties : une tête globulaire

formée de domaines immunoglobulines qui entre en contact avec le CMH-I, et le corps comprenant 75 % de la longueur et ayant une région charnière flexible permettant à la molécule d'adopter plusieurs conformations (343). L'influx calcique suite à l'activation cellulaire pourrait réduire la concentration de calcium extracellulaire et induire ce changement de conformation. Plusieurs autres protéines de surface tel LFA1 (344), CD11b (345) et les intégrines possèdent plusieurs conformations et il a été démontré que le changement conformationnel des intégrines est aussi calcium-dépendant (346) et initié par la phosphorylation intracellulaire de la queue cytoplasmique suivant l'activation par le TCR (347, 348). La phosphorylation de la queue intracytoplasmique de CD8 suivant l'activation par le TCR a aussi été démontrée (349, 350) et pourrait mener à un changement de conformation impliquant la libération des ions de calcium sur la molécule CD8. Un tel changement conformationnel pourrait permettre le désengagement du complexe CD8-CMH-I et ainsi initier le recyclage des récepteurs.

Il a été démontré que le CD8 $\alpha$  murin adopte 2 conformations, dont l'une est stabilisée par certains anticorps et mène à une plus grande affinité envers les CMH-I (351). Pour que les tétramères de CMH-I se lient au TCR, la présence du co-récepteur CD8 est requise puisque certains anticorps monoclonaux dirigés contre CD8 (clones MCD8, 3B5, DK25 et SK1) bloquent cette liaison. Cette neutralisation dépend directement de l'action de l'anticorps sur CD8 et ne semble pas être dû à une modification de la distribution du TCR comme il avait été suggéré (352). Par contre, l'anticorps monoclonal OKT8 augmente la liaison CMH-I-TCR (341, 353, 354). Bien que l'effet des anticorps RPA.T8, Leu2a et YTC182.20 sur la liaison CMH-I-TCR n'aie pas été rapporté, si on transpose nos données vers le modèle murin, il est possible que l'anticorps OKT8 anti-CD8 $\alpha$  humain se comporte comme l'anticorps 53.6.7 anti-CD8 $\alpha$  murin rapporté par Devine et al. (351) qui induit une plus haute affinité de CD8 envers les CMH-I inhibant ainsi le changement de conformation de CD8.

## RÉFÉRENCES

---

1. Ellis, H. M. et H. R. Horvitz. 1986. "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*". Cell vol. 44, p. 817-829.
2. Kanduc, D., A. Mittelman, R. Serpico, E. Sinigaglia, A. A. Sinha, C. Natale, R. Santacroce, M. G. Di Corcia, A. Lucchese, L. Dini, P. Pani, S. Santacroce, S. Simone, R. Bucci et E. Farber. 2002. "Cell death: apoptosis versus necrosis (review)". Int J Oncol vol. 21, p. 165-170.
3. Bohm, I. et H. Schild. 2003. "Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death". Mol Imaging Biol vol. 5, p. 2-14.
4. Collette, Y., A. Gilles, P. Pontarotti et D. Olive. 2003. "A co-evolution perspective of the TNFSF and TNFRSF families in the immune system". Trends Immunol vol. 24, p. 387-394.
5. Locksley, R. M., N. Killeen et M. J. Lenardo. 2001. "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology". Cell vol. 104, p. 487-501.
6. Ashkenazi, A. et V. M. Dixit. 1998. "Death receptors: signaling and modulation". Science vol. 281, p. 1305-1308.
7. Tanaka, M., T. Suda, T. Takahashi et S. Nagata. 1995. "Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes". Embo J vol. 14, p. 1129-1135.
8. Karpusas, M., Y. M. Hsu, J. H. Wang, J. Thompson, S. Lederman, L. Chess et D. Thomas. 1995. "2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand". Structure vol. 3, p. 1426.
9. Eck, M. J. et S. R. Sprang. 1989. "The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding". J Biol Chem vol. 264, p. 17595-17605.
10. Cha, S. S., M. S. Kim, Y. H. Choi, B. J. Sung, N. K. Shin, H. C. Shin, Y. C. Sung et B. H. Oh. 1999. "2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity". Immunity vol. 11, p. 253-261.

11. Jones, E. Y., D. I. Stuart et N. P. Walker. 1989. "Structure of tumour necrosis factor". Nature vol. 338, p. 225-228.
12. Seol, D. W. et T. R. Billiar. 2000. "Cysteine 230 modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activity". Cancer Res vol. 60, p. 3152-3154.
13. Hymowitz, S. G., M. P. O'Connell, M. H. Ultsch, A. Hurst, K. Totpal, A. Ashkenazi, A. M. de Vos et R. F. Kelley. 2000. "A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL". Biochemistry vol. 39, p. 633-640.
14. Suda, T. et S. Nagata. 1994. "Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis". J Exp Med vol. 179, p. 873-879.
15. Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein et S. Nagata. 1993. "Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family". Cell vol. 75, p. 1169-1178.
16. Nagata, S. 1999. "Fas ligand-induced apoptosis". Annu Rev Genet vol. 33, p. 29-55.
17. Martinez-Lorenzo, M. J., A. Anel, S. Gamen, I. Monle n, P. Lasierra, L. Larrad, A. Pineiro, M. A. Alava et J. Naval. 1999. "Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles". J Immunol vol. 163, p. 1274-1281.
18. Bossi, G. et G. M. Griffiths. 1999. "Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells". Nat Med vol. 5, p. 90-96.
19. Griffith, T. S., T. Brunner, S. M. Fletcher, D. R. Green et T. A. Ferguson. 1995. "Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege". Science vol. 270, p. 1189-1192.
20. Kerstan, A. et T. Hunig. 2004. "Cutting edge: distinct TCR- and CD28-derived signals regulate CD95L, Bcl-xL, and the survival of primary T cells". J Immunol vol. 172, p. 1341-1345.
21. Nagata, S. et T. Suda. 1995. "Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations". Immunol Today vol. 16, p. 39-43.

22. Mariani, S. M., B. Matiba, C. Baumler et P. H. Krammer. 1995. "Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases". Eur J Immunol vol. 25, p. 2303-2307.
23. Kayagaki, N., A. Kawasaki, T. Ebata, H. Ohmoto, S. Ikeda, S. Inoue, K. Yoshino, K. Okumura et H. Yagita. 1995. "Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand". J Exp Med vol. 182, p. 1777-1783.
24. Schneider, P., N. Holler, J. L. Bodmer, M. Hahne, K. Frei, A. Fontana et J. Tschopp. 1998. "Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity". J Exp Med vol. 187, p. 1205-1213.
25. Tanaka, M., T. Itai, M. Adachi et S. Nagata. 1998. "Downregulation of Fas ligand by shedding". Nat Med vol. 4, p. 31-36.
26. Giambernardi, T. A., G. M. Grant, G. P. Taylor, R. J. Hay, V. M. Maher, J. J. McCormick et R. J. Klebe. 1998. "Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells". Matrix Biol vol. 16, p. 483-496.
27. Smith, M. M., L. Shi et M. Navre. 1995. "Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries". J Biol Chem vol. 270, p. 6440-6449.
28. Powell, W. C., B. Fingleton, C. L. Wilson, M. Boothby et L. M. Matrisian. 1999. "The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis". Curr Biol vol. 9, p. 1441-1447.
29. Yonehara, S., A. Ishii et M. Yonehara. 1989. "A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor". J Exp Med vol. 169, p. 1747-1756.
30. Krammer, P. H. 2000. "CD95's deadly mission in the immune system". Nature vol. 407, p. 789-795.

31. Imler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French et J. Tschopp. 1997. "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP". Nature vol. 388, p. 190-195.
32. Thornberry, N. A. et Y. Lazebnik. 1998. "Caspases: enemies within". Science vol. 281, p. 1312-1316.
33. Esposti, M. D. 2002. "The roles of Bid". Apoptosis vol. 7, p. 433-440.
34. Tang, D., J. M. Lahti, J. Grenet et V. J. Kidd. 1999. "Cycloheximide-induced T-cell death is mediated by a Fas-associated death domain-dependent mechanism". J Biol Chem vol. 274, p. 7245-7252.
35. Wajant, H., E. Haas, R. Schwenzler, F. Muhlenbeck, S. Kreuz, G. Schubert, M. Grell, C. Smith et P. Scheurich. 2000. "Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD)". J Biol Chem vol. 275, p. 24357-24366.
36. Strasser, A., D. C. Huang et D. L. Vaux. 1997. "The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy". Biochim Biophys Acta vol. 1333, p. F151-178.
37. Shi, Y. 2002. "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis". Mol Cell vol. 9, p. 459-470.
38. Verhagen, A. M. et D. L. Vaux. 2002. "Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac". Apoptosis vol. 7, p. 163-166.
39. Cheng, E. H., D. G. Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno et J. M. Hardwick. 1997. "Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases". Science vol. 278, p. 1966-1968.
40. Stennicke, H. R., Q. L. Deveraux, E. W. Humke, J. C. Reed, V. M. Dixit et G. S. Salvesen. 1999. "Caspase-9 can be activated without proteolytic processing". J Biol Chem vol. 274, p. 8359-8362.
41. Jekely, G. 1998. "Caspases: The Cell Death Proteases". Neural Notes vol. 4, p. 2-4.

42. Martinon, F., K. Burns et J. Tschopp. 2002. "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta". Mol Cell vol. 10, p. 417-426.
43. Schweizer, A., C. Briand et M. G. Grutter. 2003. "Crystal structure of caspase-2, apical initiator of the intrinsic apoptotic pathway". J Biol Chem vol. 278, p. 42441-42447.
44. Fischer, U., R. U. Janicke et K. Schulze-Osthoff. 2003. "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates". Cell Death Differ vol. 10, p. 76-100.
45. Griffith, T. S. et T. A. Ferguson. 1997. "The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege". Immunol Today vol. 18, p. 240-244.
46. Streilein, J. W. 1996. "Peripheral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues". Transplant Proc vol. 28, p. 2066-2070.
47. Griffith, T. S., X. Yu, J. M. Herndon, D. R. Green et T. A. Ferguson. 1996. "CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance". Immunity vol. 5, p. 7-16.
48. Walker, P. R., P. Saas et P. Y. Dietrich. 1997. "Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back". J Immunol vol. 158, p. 4521-4524.
49. Strand, S. et P. R. Galle. 1998. "Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications". Mol Med Today vol. 4, p. 63-68.
50. Hahne, M., D. Rimoldi, M. Schroter, P. Romero, M. Schreier, L. E. French, P. Schneider, T. Bornand, A. Fontana, D. Lienard, J. Cerottini et J. Tschopp. 1996. "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape". Science vol. 274, p. 1363-1366.
51. Bellone, G., C. Smirne, A. Carbone, K. Mareschi, L. Dughera, E. C. Farina, O. Alabiso, G. Valente, G. Emanuelli et U. Rodeck. 2000. "Production and pro-apoptotic activity of soluble CD95 ligand in pancreatic carcinoma". Clin Cancer Res vol. 6, p. 2448-2455.

52. Mitsiades, N., V. Poulaki, V. Kotoula, A. Leone et M. Tsokos. 1998. "Fas ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase". Am J Pathol vol. 153, p. 1947-1956.
53. Koyama, S., N. Koike et S. Adachi. 2001. "Fas receptor counterattack against tumor-infiltrating lymphocytes in vivo as a mechanism of immune escape in gastric carcinoma". J Cancer Res Clin Oncol vol. 127, p. 20-26.
54. Strand, S., W. J. Hofmann, H. Hug, M. Muller, G. Otto, D. Strand, S. M. Mariani, W. Stremmel, P. H. Krammer et P. R. Galle. 1996. "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?" Nat Med vol. 2, p. 1361-1366.
55. Billingham, R. E., L. Brent et P. B. Medawar. 1953. "Activity acquired tolerance of foreign cells". Nature vol. 172, p. 603-606.
56. George, J. F., S. D. Sweeney, J. K. Kirklin, E. M. Simpson, D. R. Goldstein et J. M. Thomas. 1998. "An essential role for Fas ligand in transplantation tolerance induced by donor bone marrow". Nat Med vol. 4, p. 333-335.
57. Selawry, H. P. et D. F. Cameron. 1993. "Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell transplantation". Cell Transplant vol. 2, p. 123-129.
58. Bellgrau, D., D. Gold, H. Selawry, J. Moore, A. Franzusoff et R. C. Duke. 1995. "A role for CD95 ligand in preventing graft rejection". Nature vol. 377, p. 630-632.
59. Lau, H. T., M. Yu, A. Fontana et C. J. Stoeckert, Jr. 1996. "Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice". Science vol. 273, p. 109-112.
60. Swenson, K. M., B. Ke, T. Wang, J. S. Markowitz, M. A. Maggard, G. S. Spear, D. K. Imagawa, J. A. Goss, R. W. Busuttil et P. Seu. 1998. "Fas ligand gene transfer to renal allografts in rats: effects on allograft survival". Transplantation vol. 65, p. 155-160.

61. Saitoh, A., T. Kawanabe, H. Weidong, N. Kayagaki, T. Kawamura, H. Yagita, K. Okumura et S. Shimada. 2000. "Selective upregulation of fibroblast Fas ligand expression, and prolongation of Fas/Fas ligand-mediated skin allograft survival, by retinoic acid: the skin as a retinoid-inducible immune privilege site". J Invest Dermatol vol. 115, p. 154-161.
62. Zhang, H. G., X. Su, D. Liu, W. Liu, P. Yang, Z. Wang, C. K. Edwards, H. Bluethmann, J. D. Mountz et T. Zhou. 1999. "Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells". J Immunol vol. 162, p. 1423-1430.
63. Wu, B., J. M. Wu, A. Miagkov, R. N. Adams, H. I. Levitsky et D. B. Drachman. 2001. "Specific immunotherapy by genetically engineered APCs: the "guided missile" strategy". J Immunol vol. 166, p. 4773-4779.
64. Wu, J. M., B. Wu, A. Miagkov, R. N. Adams et D. B. Drachman. 2001. "Specific immunotherapy of experimental myasthenia gravis in vitro: the "guided missile" strategy". Cell Immunol vol. 208, p. 137-147.
65. Min, W. P., R. Goczynski, X. Y. Huang, M. Kushida, P. Kim, M. Obataki, J. Lei, R. M. Suri et M. S. Cattral. 2000. "Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival". J Immunol vol. 164, p. 161-167.
66. Matsue, H., K. Matsue, M. Walters, K. Okumura, H. Yagita et A. Takashima. 1999. "Induction of antigen-specific immunosuppression by CD95L cDNA-transfected 'killer' dendritic cells". Nat Med vol. 5, p. 930-937.
67. O'Connell, J., A. Houston, M. W. Bennett, G. C. O'Sullivan et F. Shanahan. 2001. "Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma". Nat Med vol. 7, p. 271-274.
68. Turvey, S. E., V. Gonzalez-Nicolini, C. I. Kingsley, A. T. Larregina, P. J. Morris, M. G. Castro, P. R. Lowenstein et K. J. Wood. 2000. "Fas ligand-transfected myoblasts and islet cell transplantation". Transplantation vol. 69, p. 1972-1976.

69. Kang, S. M., D. B. Schneider, Z. Lin, D. Hanahan, D. A. Dichek, P. G. Stock et S. Baekkeskov. 1997. "Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction". Nat Med vol. 3, p. 738-743.
70. Allison, J., H. M. Georgiou, A. Strasser et D. L. Vaux. 1997. "Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts". Proc Natl Acad Sci U S A vol. 94, p. 3943-3947.
71. Kang, S. M., Z. Lin, N. L. Ascher et P. G. Stock. 1998. "Fas ligand expression on islets as well as multiple cell lines results in accelerated neutrophilic rejection". Transplant Proc vol. 30, p. 538.
72. Takeuchi, T., T. Ueki, H. Nishimatsu, T. Kajiwara, T. Ishida, K. Jishage, O. Ueda, H. Suzuki, B. Li, N. Moriyama et T. Kitamura. 1999. "Accelerated rejection of Fas ligand-expressing heart grafts". J Immunol vol. 162, p. 518-522.
73. Chen, J. J., Y. Sun et G. J. Nabel. 1998. "Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L)". Science vol. 282, p. 1714-1717.
74. Seino, K., N. Kayagaki, K. Okumura et H. Yagita. 1997. "Antitumor effect of locally produced CD95 ligand". Nat Med vol. 3, p. 165-170.
75. Okamoto, S., S. Takamizawa, W. Bishop, J. Wen, K. Kimura et A. Sandler. 1999. "Overexpression of Fas ligand does not confer immune privilege to a pancreatic beta tumor cell line (betaTC-3)". J Surg Res vol. 84, p. 77-81.
76. Igney, F. H., C. K. Behrens et P. H. Krammer. 2003. "The influence of CD95L expression on tumor rejection in mice". Eur J Immunol vol. 33, p. 2811-2821.
77. Suttles, J., G. A. Schwarting et R. D. Stout. 1986. "Flow cytometric analysis reveals the presence of asialo GM1 on the surface membrane of alloimmune cytotoxic T lymphocytes". J Immunol vol. 136, p. 1586-1591.
78. Ferguson, T. A., D. R. Green et T. S. Griffith. 2002. "Cell death and immune privilege". Int Rev Immunol vol. 21, p. 153-172.

79. Pettmann, B. et C. E. Henderson. 2003. "Killer wiles: growing interest in Fas". Nat Cell Biol vol. 5, p. 91-92.
80. Chen, Y. L., S. H. Chen, J. Y. Wang et B. C. Yang. 2003. "Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils". J Immunol vol. 171, p. 1183-1191.
81. Batteux, F., P. Lores, D. Bucchini et G. Chiocchia. 2000. "Transgenic expression of Fas ligand on thyroid follicular cells prevents autoimmune thyroiditis". J Immunol vol. 164, p. 1681-1688.
82. Tourneur, L., B. Malassagne, F. Batteux, M. Fabre, S. Mistou, E. Lallemand, P. Lores et G. Chiocchia. 2001. "Transgenic expression of CD95 ligand on thyroid follicular cells confers immune privilege upon thyroid allografts". J Immunol vol. 167, p. 1338-1346.
83. Gao, Y., J. M. Herndon, H. Zhang, T. S. Griffith et T. A. Ferguson. 1998. "Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis". J Exp Med vol. 188, p. 887-896.
84. Daigle, I., B. Ruckert, G. Schnetzler et H. U. Simon. 2000. "Induction of the IL-10 gene via the fas receptor in monocytes--an anti-inflammatory mechanism in the absence of apoptosis". Eur J Immunol vol. 30, p. 2991-2997.
85. Seino, K., K. Iwabuchi, N. Kayagaki, R. Miyata, I. Nagaoka, A. Matsuzawa, K. Fukao, H. Yagita et K. Okumura. 1998. "Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes". J Immunol vol. 161, p. 4484-4488.
86. Ottonello, L., G. Tortolina, M. Amelotti et F. Dallegri. 1999. "Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes". J Immunol vol. 162, p. 3601-3606.
87. Waku, T., T. Fujiwara, J. Shao, T. Itoshima, T. Murakami, M. Kataoka, S. Gomi, J. A. Roth et N. Tanaka. 2000. "Contribution of CD95 ligand-induced neutrophil infiltration to the bystander effect in p53 gene therapy for human cancer". J Immunol vol. 165, p. 5884-5890.

88. Behrens, C. K., F. H. Igney, B. Arnold, P. Moller et P. H. Krammer. 2001. "CD95 ligand-expressing tumors are rejected in anti-tumor TCR transgenic perforin knockout mice". J Immunol vol. 166, p. 3240-3247.
89. Park, D. R., A. R. Thomsen, C. W. Frevert, U. Pham, S. J. Skerrett, P. A. Kiener et W. C. Liles. 2003. "Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages". J Immunol vol. 170, p. 6209-6216.
90. Hohlbaum, A. M., M. S. Gregory, S. T. Ju et A. Marshak-Rothstein. 2001. "Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages in vivo induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors". J Immunol vol. 167, p. 6217-6224.
91. Miwa, K., M. Asano, R. Horai, Y. Iwakura, S. Nagata et T. Suda. 1998. "Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand". Nat Med vol. 4, p. 1287-1292.
92. Shudo, K., K. Kinoshita, R. Imamura, H. Fan, K. Hasumoto, M. Tanaka, S. Nagata et T. Suda. 2001. "The membrane-bound but not the soluble form of human Fas ligand is responsible for its inflammatory activity". Eur J Immunol vol. 31, p. 2504-2511.
93. Kang, S. M., D. Braat, D. B. Schneider, R. W. O'Rourke, Z. Lin, N. L. Ascher, D. A. Dichek, S. Baekkeskov et P. G. Stock. 2000. "A non-cleavable mutant of Fas ligand does not prevent neutrophilic destruction of islet transplants". Transplantation vol. 69, p. 1813-1817.
94. Renshaw, S. A., J. S. Parmar, V. Singleton, S. J. Rowe, D. H. Dockrell, S. K. Dower, C. D. Bingle, E. R. Chilvers et M. K. Whyte. 2003. "Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL". J Immunol vol. 170, p. 1027-1033.
95. Wajant, H., K. Pfizenmaier et P. Scheurich. 2003. "Non-apoptotic Fas signaling". Cytokine Growth Factor Rev vol. 14, p. 53-66.
96. Holmstrom, T. H. et J. E. Eriksson. 2000. "Phosphorylation-Based signaling in Fas receptor-mediated apoptosis". Crit Rev Immunol vol. 20, p. 121-152.

97. Ahn, J. H., S. M. Park, H. S. Cho, M. S. Lee, J. B. Yoon, J. Vilcek et T. H. Lee. 2001. "Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression". J Biol Chem vol. 276, p. 47100-47106.
98. Abreu-Martin, M. T., A. Vidrich, D. H. Lynch et S. R. Targan. 1995. "Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen". J Immunol vol. 155, p. 4147-4154.
99. Choi, C., X. Xu, J. W. Oh, S. J. Lee, G. Y. Gillespie, H. Park, H. Jo et E. N. Benveniste. 2001. "Fas-induced expression of chemokines in human glioma cells: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase". Cancer Res vol. 61, p. 3084-3091.
100. Hor, W. S., W. L. Huang, Y. S. Lin et B. C. Yang. 2003. "Cross-talk between tumor cells and neutrophils through the Fas (APO-1, CD95)/FasL system: human glioma cells enhance cell viability and stimulate cytokine production in neutrophils". J Leukoc Biol vol. 73, p. 363-368.
101. Schaub, F. J., D. K. Han, W. C. Liles, L. D. Adams, S. A. Coats, R. K. Ramachandran, R. A. Seifert, S. M. Schwartz et D. F. Bowen-Pope. 2000. "Fas/FADD-mediated activation of a specific program of inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells". Nat Med vol. 6, p. 790-796.
102. Schaub, F. J., W. C. Liles, N. Ferri, K. Sayson, R. A. Seifert et D. F. Bowen-Pope. 2003. "Fas and Fas-associated death domain protein regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression by human smooth muscle cells through caspase- and calpain-dependent release of interleukin-1alpha". Circ Res vol. 93, p. 515-522.
103. Itoi, H., Y. Fujimori, H. Tsutsui, K. Matsui, S. Futatsugi, H. Okamura, H. Hara, T. Hada, E. Kakishita et K. Nakanishi. 2001. "Fas ligand-induced caspase-1-dependent accumulation of interleukin-18 in mice with acute graft-versus-host disease". Blood vol. 98, p. 235-237.

104. Tsutsui, H., N. Kayagaki, K. Kuida, H. Nakano, N. Hayashi, K. Takeda, K. Matsui, S. Kashiwamura, T. Hada, S. Akira, H. Yagita, H. Okamura et K. Nakanishi. 1999. "Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice". Immunity vol. 11, p. 359-367.
105. Scheller, C., S. Sopper, C. Ehrhardt, E. Flory, P. Chen, E. Koutsilieris, S. Ludwig, V. ter Meulen et C. Jassoy. 2002. "Caspase inhibitors induce a switch from apoptotic to proinflammatory signaling in CD95-stimulated T lymphocytes". Eur J Immunol vol. 32, p. 2471-2480.
106. Rescigno, M., V. Piguet, B. Valzasina, S. Lens, R. Zubler, L. French, V. Kindler, J. Tschopp et P. Ricciardi-Castagnoli. 2000. "Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses". J Exp Med vol. 192, p. 1661-1668.
107. Kennedy, N. J., T. Kataoka, J. Tschopp et R. C. Budd. 1999. "Caspase activation is required for T cell proliferation". J Exp Med vol. 190, p. 1891-1896.
108. Alam, A., L. Y. Cohen, S. Aouad et R. P. Sekaly. 1999. "Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells". J Exp Med vol. 190, p. 1879-1890.
109. Beisner, D. R., I. H. Chu, A. F. Arechiga, S. M. Hedrick et C. M. Walsh. 2003. "The requirements for Fas-associated death domain signaling in mature T cell activation and survival". J Immunol vol. 171, p. 247-256.
110. Chun, H. J., L. Zheng, M. Ahmad, J. Wang, C. K. Speirs, R. M. Siegel, J. K. Dale, J. Puck, J. Davis, C. G. Hall, S. Skoda-Smith, T. P. Atkinson, S. E. Straus et M. J. Lenardo. 2002. "Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency". Nature vol. 419, p. 395-399.

111. Flavell, R. A. 2002. "The relationship of inflammation and initiation of autoimmune disease: role of TNF super family members". Curr Top Microbiol Immunol vol. 266, p. 1-9.
112. Choi, C., O. Kutsch, J. Park, T. Zhou, D. W. Seol et E. N. Benveniste. 2002. "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces caspase-dependent interleukin-8 expression and apoptosis in human astrogloma cells". Mol Cell Biol vol. 22, p. 724-736.
113. Yopp, A. C., G. J. Randolph et J. S. Bromberg. 2003. "Leukotrienes, sphingolipids, and leukocyte trafficking". J Immunol vol. 171, p. 5-10.
114. Funk, C. D. 2001. "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology". Science vol. 294, p. 1871-1875.
115. Nelson, P. J. et A. M. Krensky. 2001. "Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection". Immunity vol. 14, p. 377-386.
116. Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre et L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. "Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects". Lab Invest vol. 80, p. 617-653.
117. Rossi, A. et P. Hellewell. 1994. "Immunopharmacology of neutrophils". Academic Press, London, UK.
118. Siddiqui, R. A., L. P. Akard, J. G. Garcia, Y. Cui et D. English. 1999. "Chemotactic migration triggers IL-8 generation in neutrophilic leukocytes". J Immunol vol. 162, p. 1077-1083.
119. Bazzoni, F., M. A. Cassatella, F. Rossi, M. Ceska, B. Dewald et M. Baggiolini. 1991. "Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8". J Exp Med vol. 173, p. 771-774.
120. Cassatella, M. A. 1999. "Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound". Adv Immunol vol. 73, p. 369-509.
121. Edwards, S. 1994. "Biochemistry and Physiology of the neutrophil". Cambridge University Press, Cambridge, Australia, 319 pp.
122. Perussia, B. 1991. "Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines". Curr Opin Immunol vol. 3, p. 49-55.

123. Kiessling, R., E. Klein et H. Wigzell. 1975. "'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype". Eur J Immunol vol. 5, p. 112-117.
124. Lanier, L. L., A. M. Le, C. I. Civin, M. R. Loken et J. H. Phillips. 1986. "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes". J Immunol vol. 136, p. 4480-4486.
125. Cooper, M. A., T. A. Fehniger et M. A. Caligiuri. 2001. "The biology of human natural killer-cell subsets". Trends Immunol vol. 22, p. 633-640.
126. Robertson, M. J. 2002. "Role of chemokines in the biology of natural killer cells". J Leukoc Biol vol. 71, p. 173-183.
127. Cooper, M. A., T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaheri, T. Ghayur, W. E. Carson et M. A. Caligiuri. 2001. "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset". Blood vol. 97, p. 3146-3151.
128. Peritt, D., S. Robertson, G. Gri, L. Showe, M. Aste-Amezaga et G. Trinchieri. 1998. "Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets". J Immunol vol. 161, p. 5821-5824.
129. Moretta, A., G. Tambussi, C. Bottino, G. Tripodi, A. Merli, E. Ciccone, G. Pantaleo et L. Moretta. 1990. "A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function". J Exp Med vol. 171, p. 695-714.
130. Moretta, L., E. Ciccone, D. Pende, O. Viale, C. Di Donato, G. Tripodi, A. M. Orengo, J. Guardiola et A. Moretta. 1992. "Existence of a natural killer (NK) cell repertoire for (allo)antigen recognition: definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans". Pharmacol Res vol. 26 Suppl 2, p. 98-99.
131. Moretta, A., M. Vitale, S. Sivori, L. Morelli, D. Pende et C. Bottino. 1996. "Inhibitory and activatory receptors for HLA class I molecules in human natural killer cells". Chem Immunol vol. 64, p. 77-87.

132. Trambas, C. M. et G. M. Griffiths. 2003. "Delivering the kiss of death". Nat Immunol vol. 4, p. 399-403.
133. Pinkoski, M. J., M. Hobman, J. A. Heibein, K. Tomaselli, F. Li, P. Seth, C. J. Froelich et R. C. Bleackley. 1998. "Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis". Blood vol. 92, p. 1044-1054.
134. Motyka, B., G. Korbitt, M. J. Pinkoski, J. A. Heibein, A. Caputo, M. Hobman, M. Barry, I. Shostak, T. Sawchuk, C. F. Holmes, J. Gaudie et R. C. Bleackley. 2000. "Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis". Cell vol. 103, p. 491-500.
135. Barry, M. et R. C. Bleackley. 2002. "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death". Nat Rev Immunol vol. 2, p. 401-409.
136. Wallin, R. P., V. Screpanti, J. Michaelsson, A. Grandien et H. G. Ljunggren. 2003. "Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity". Eur J Immunol vol. 33, p. 2727-2735.
137. Medvedev, A. E., A. C. Johnsen, J. Haux, B. Steinkjer, K. Egeberg, D. H. Lynch, A. Sundan et T. Espevik. 1997. "Regulation of Fas and Fas-ligand expression in NK cells by cytokines and the involvement of Fas-ligand in NK/LAK cell-mediated cytotoxicity". Cytokine vol. 9, p. 394-404.
138. Karre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek et R. Kiessling. 1986. "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy". Nature vol. 319, p. 675-678.
139. Ljunggren, H. G. et K. Karre. 1990. "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition". Immunol Today vol. 11, p. 237-244.
140. Moretta, L., C. Bottino, D. Pende, M. C. Mingari, R. Biassoni et A. Moretta. 2002. "Human natural killer cells: their origin, receptors and function". Eur J Immunol vol. 32, p. 1205-1211.
141. Yokoyama, W. M. 1993. "Recognition structures on natural killer cells". Curr Opin Immunol vol. 5, p. 67-73.

142. Valiante, N. M., M. Uhrberg, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K. L. Arnett, A. D'Andrea, J. H. Phillips, L. L. Lanier et P. Parham. 1997. "Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors". Immunity vol. 7, p. 739-751.
143. Borrego, F., J. Kabat, D. K. Kim, L. Lieto, K. Maasho, J. Pena, R. Solana et J. E. Coligan. 2002. "Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells". Mol Immunol vol. 38, p. 637-660.
144. Moretta, A., C. Bottino, D. Pende, G. Tripodi, G. Tambussi, O. Viale, A. Orengo, M. Barbaresi, A. Merli et E. Ciccone. 1990. "Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition". J Exp Med vol. 172, p. 1589-1598.
145. Ferrini, S., A. Cambiaggi, R. Meazza, S. Sforzini, S. Marciano, M. C. Mingari et L. Moretta. 1994. "T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function". Eur J Immunol vol. 24, p. 2294-2298.
146. Anfossi, N., V. Pascal, E. Vivier et S. Ugolini. 2001. "Biology of T memory type 1 cells". Immunol Rev vol. 181, p. 269-278.
147. Huard, B. et L. Karlsson. 2000. "KIR expression on self-reactive CD8+ T cells is controlled by T-cell receptor engagement". Nature vol. 403, p. 325-328.
148. Vely, F., M. Peyrat, C. Couedel, J. Morcet, F. Halary, F. Davodeau, F. Romagne, E. Scotet, X. Saulquin, E. Houssaint, N. Schleinitz, A. Moretta, E. Vivier et M. Bonneville. 2001. "Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements". J Immunol vol. 166, p. 2487-2494.
149. Braud, V., E. Y. Jones et A. McMichael. 1997. "The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal

- sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9". Eur J Immunol vol. 27, p. 1164-1169.
150. Mingari, M. C., M. Ponte, S. Bertone, F. Schiavetti, C. Vitale, R. Bellomo, A. Moretta et L. Moretta. 1998. "HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells". Proc Natl Acad Sci U S A vol. 95, p. 1172-1177.
  151. Bertone, S., F. Schiavetti, R. Bellomo, C. Vitale, M. Ponte, L. Moretta et M. C. Mingari. 1999. "Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes". Eur J Immunol vol. 29, p. 23-29.
  152. Houchins, J. P., T. Yabe, C. McSherry et F. H. Bach. 1991. "DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells". J Exp Med vol. 173, p. 1017-1020.
  153. Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier et J. H. Phillips. 1999. "An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10". Science vol. 285, p. 730-732.
  154. Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M. S. Topp, S. R. Riddell et T. Spies. 2001. "Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells". Nat Immunol vol. 2, p. 255-260.
  155. Maasho, K., J. Opoku-Anane, A. Marusina, J. Coligan et F. Borrego. 2005. "Cutting Edge: NKG2D Is a Costimulatory Receptor for Human Naive CD8+ T Cells". J Immunol vol. 174, p. 4480-4484.
  156. Ahmad, A. et F. Alvarez. 2004. "Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis". J Leukoc Biol vol. 76, p. 743-759.

157. Ehrlich, L. I., K. Ogasawara, J. A. Hamerman, R. Takaki, A. Zingoni, J. P. Allison et L. L. Lanier. 2005. "Engagement of NKG2D by Cognate Ligand or Antibody Alone Is Insufficient to Mediate Costimulation of Human and Mouse CD8+ T Cells". J Immunol vol. 174, p. 1922-1931.
158. Sutherland, C. L., N. J. Chalupny, K. Schooley, T. VandenBos, M. Kubin et D. Cosman. 2002. "UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells". J Immunol vol. 168, p. 671-679.
159. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier et T. Spies. 1999. "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA". Science vol. 285, p. 727-729.
160. Groh, V., J. Wu, C. Yee et T. Spies. 2002. "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation". Nature vol. 419, p. 734-738.
161. Cosman, D., J. Mullberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin et N. J. Chalupny. 2001. "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor". Immunity vol. 14, p. 123-133.
162. Sivori, S., M. Vitale, L. Morelli, L. Sanseverino, R. Augugliaro, C. Bottino, L. Moretta et A. Moretta. 1997. "p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation". J Exp Med vol. 186, p. 1129-1136.
163. Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta et A. Moretta. 1998. "NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis". J Exp Med vol. 187, p. 2065-2072.

164. Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta et A. Moretta. 1999. "Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells". J Exp Med vol. 190, p. 1505-1516.
165. Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino, M. C. Mingari et L. Moretta. 2000. "Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity". Immunol Today vol. 21, p. 228-234.
166. Sivori, S., S. Parolini, M. Falco, E. Marcenaro, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta et A. Moretta. 2000. "2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation". Eur J Immunol vol. 30, p. 787-793.
167. Sivori, S., D. Pende, C. Bottino, E. Marcenaro, A. Pessino, R. Biassoni, L. Moretta et A. Moretta. 1999. "NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells". Eur J Immunol vol. 29, p. 1656-1666.
168. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni et L. Moretta. 2001. "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity". Annu Rev Immunol vol. 19, p. 197-223.
169. Mandelboim, O., N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T. I. Arnon, Y. Bushkin, D. M. Davis, J. L. Strominger, J. W. Yewdell et A. Porgador. 2001. "Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells". Nature vol. 409, p. 1055-1060.
170. Arnon, T. I., M. Lev, G. Katz, Y. Chernobrov, A. Porgador et O. Mandelboim. 2001. "Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30". Eur J Immunol vol. 31, p. 2680-2689.

171. Ferlazzo, G., M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman et C. Munz. 2002. "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells". J Exp Med vol. 195, p. 343-351.
172. Kubin, M. Z., D. L. Parshley, W. Din, J. Y. Waugh, T. Davis-Smith, C. A. Smith, B. M. Macduff, R. J. Armitage, W. Chin, L. Cassiano, L. Borges, M. Petersen, G. Trinchieri et R. G. Goodwin. 1999. "Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48". Eur J Immunol vol. 29, p. 3466-3477.
173. Valiante, N. M. et G. Trinchieri. 1993. "Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes". J Exp Med vol. 178, p. 1397-1406.
174. Nakajima, H. et M. Colonna. 2000. "2B4: an NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism". Hum Immunol vol. 61, p. 39-43.
175. Assarsson, E., T. Kambayashi, J. D. Schatzle, S. O. Cramer, A. von Bonin, P. E. Jensen, H. G. Ljunggren et B. J. Chambers. 2004. "NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions". J Immunol vol. 173, p. 174-180.
176. Kambayashi, T., E. Assarsson, B. J. Chambers et H. G. Ljunggren. 2001. "Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions". J Immunol vol. 167, p. 6706-6710.
177. Lee, K. M., S. Bhawan, T. Majima, H. Wei, M. I. Nishimura, H. Yagita et V. Kumar. 2003. "Cutting edge: the NK cell receptor 2B4 augments antigen-specific T cell cytotoxicity through CD48 ligation on neighboring T cells". J Immunol vol. 170, p. 4881-4885.
178. Klem, J., P. C. Verrett, V. Kumar et J. D. Schatzle. 2002. "2B4 is constitutively associated with linker for the activation of T cells in glycolipid-enriched microdomains: properties required for 2B4 lytic function". J Immunol vol. 169, p. 55-62.

179. Jevremovic, D., D. D. Billadeau, R. A. Schoon, C. J. Dick, B. J. Irvin, W. Zhang, L. E. Samelson, R. T. Abraham et P. J. Leibson. 1999. "Cutting edge: a role for the adaptor protein LAT in human NK cell-mediated cytotoxicity". J Immunol vol. 162, p. 2453-2456.
180. Parolini, S., C. Bottino, M. Falco, R. Augugliaro, S. Gilliani, R. Franceschini, H. D. Ochs, H. Wolf, J. Y. Bonnefoy, R. Biassoni, L. Moretta, L. D. Notarangelo et A. Moretta. 2000. "X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells". J Exp Med vol. 192, p. 337-346.
181. McNerney, M. E., K. M. Lee et V. Kumar. 2005. "2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8(+) T cells". Mol Immunol vol. 42, p. 489-494.
182. Takasaki, S., K. Hayashida, C. Morita, H. Ishibashi et Y. Niho. 2000. "CD56 directly interacts in the process of NCAM-positive target cell-killing by NK cells". Cell Biol Int vol. 24, p. 101-108.
183. Pittet, M. J., D. E. Speiser, D. Valmori, J. C. Cerottini et P. Romero. 2000. "Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression". J Immunol vol. 164, p. 1148-1152.
184. Lanier, L. L., C. Chang, M. Azuma, J. J. Ruitenber, J. J. Hemperly et J. H. Phillips. 1991. "Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56)". J Immunol vol. 146, p. 4421-4426.
185. Nitta, T., H. Yagita, K. Sato et K. Okumura. 1989. "Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction". J Exp Med vol. 170, p. 1757-1761.
186. Merino, J., M. A. Martinez-Gonzalez, M. Rubio, S. Inoges, A. Sanchez-Ibarrola et M. L. Subira. 1998. "Progressive decrease of CD8high+ CD28+ CD57- cells with ageing". Clin Exp Immunol vol. 112, p. 48-51.

187. Brenchley, J. M., N. J. Karandikar, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, L. E. Crotty, J. P. Casazza, J. Kuruppu, S. A. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D. C. Douek et R. A. Koup. 2003. "Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells". Blood vol. 101, p. 2711-2720.
188. Giorda, R., W. A. Rudert, C. Vavassori, W. H. Chambers, J. C. Hiserodt et M. Trucco. 1990. "NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells". Science vol. 249, p. 1298-1300.
189. Lanier, L. L., C. Chang et J. H. Phillips. 1994. "Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes". J Immunol vol. 153, p. 2417-2428.
190. Azzoni, L., O. Zatzepina, B. Abebe, I. M. Bennett, P. Kanakaraj et B. Perussia. 1998. "Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells". J Immunol vol. 161, p. 3493-3500.
191. Poggi, A., A. Rubartelli, L. Moretta et M. R. Zocchi. 1997. "Expression and function of NKRP1A molecule on human monocytes and dendritic cells". Eur J Immunol vol. 27, p. 2965-2970.
192. Poggi, A., P. Costa, M. R. Zocchi et L. Moretta. 1997. "Phenotypic and functional analysis of CD4+ NKRP1A+ human T lymphocytes. Direct evidence that the NKRP1A molecule is involved in transendothelial migration". Eur J Immunol vol. 27, p. 2345-2350.
193. Arase, N., H. Arase, S. Y. Park, H. Ohno, C. Ra et T. Saito. 1997. "Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells". J Exp Med vol. 186, p. 1957-1963.
194. Fast, L. D., J. A. Hansen et W. Newman. 1981. "Evidence for T cell nature and heterogeneity within natural killer (NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) effectors: a comparison with cytolytic T lymphocytes (CTL)". J Immunol vol. 127, p. 448-452.

195. Minato, N., L. Reid et B. R. Bloom. 1981. "On the heterogeneity of murine natural killer cells". J Exp Med vol. 154, p. 750-762.
196. Yankelevich, B., C. Knobloch, M. Nowicki et G. Dennert. 1989. "A novel cell type responsible for marrow graft rejection in mice. T cells with NK phenotype cause acute rejection of marrow grafts". J Immunol vol. 142, p. 3423-3430.
197. Sykes, M. 1990. "Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells". J Immunol vol. 145, p. 3209-3215.
198. Ballas, Z. K. et W. Rasmussen. 1990. "NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8- thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset". J Immunol vol. 145, p. 1039-1045.
199. Ortaldo, J. R., R. T. Winkler-Pickett, H. Yagita et H. A. Young. 1991. "Comparative studies of CD3- and CD3+ CD56+ cells: examination of morphology, functions, T cell receptor rearrangement, and pore-forming protein expression". Cell Immunol vol. 136, p. 486-495.
200. Makino, Y., R. Kanno, T. Ito, K. Higashino et M. Taniguchi. 1995. "Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations". Int Immunol vol. 7, p. 1157-1161.
201. Moser, J. M., J. Gibbs, P. E. Jensen et A. E. Lukacher. 2002. "CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses". Nat Immunol vol. 3, p. 189-195.
202. Benton, M. J. 1990. "Phylogeny of the major tetrapod groups: morphological data and divergence dates". J Mol Evol vol. 30, p. 409-424.
203. Rau, L., J. Gantress, A. Bell, R. Stewart, T. Horton, N. Cohen, J. Horton et J. Robert. 2002. "Identification and characterization of Xenopus CD8+ T cells expressing an NK cell-associated molecule". Eur J Immunol vol. 32, p. 1574-1583.

204. Uhrberg, M., N. M. Valiante, N. T. Young, L. L. Lanier, J. H. Phillips et P. Parham. 2001. "The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns". J Immunol vol. 166, p. 3923-3932.
205. Andre, P., C. Brunet, S. Guia, H. Gallais, J. Sampol, E. Vivier et F. Dignat-George. 1999. "Differential regulation of killer cell Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals". Eur J Immunol vol. 29, p. 1076-1085.
206. Lieto, L. D., F. Borrego, C. H. You et J. E. Coligan. 2003. "Human CD94 gene expression: dual promoters differing in responsiveness to IL-2 or IL-15". J Immunol vol. 171, p. 5277-5286.
207. Arlettaz, L., J. Villard, C. de Rham, S. Degermann, B. Chapuis, B. Huard et E. Roosnek. 2004. "Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8+ TCR alphabeta lymphocytes". Eur J Immunol vol. 34, p. 3456-3464.
208. McMahon, C. W., A. J. Zajac, A. M. Jamieson, L. Corral, G. E. Hammer, R. Ahmed et D. H. Raulet. 2002. "Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell receptors in responding CD8(+) T cells". J Immunol vol. 169, p. 1444-1452.
209. Ou, D., D. L. Metzger, X. Wang, P. Pozzilli et A. J. Tingle. 2002. "beta-cell antigen-specific CD56(+) NKT cells from type 1 diabetic patients: autoaggressive effector T cells damage human CD56(+) beta cells by HLA-restricted and non-HLA-restricted pathways". Hum Immunol vol. 63, p. 256-270.
210. Tarazona, R., O. DelaRosa, C. Alonso, B. Ostos, J. Espejo, J. Pena et R. Solana. 2000. "Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells". Mech Ageing Dev vol. 121, p. 77-88.

211. Le Bouteiller, P., A. Barakonyi, J. Giustiniani, F. Lenfant, A. Marie-Cardine, M. Aguerre-Girr, M. Rabot, I. Hilgert, F. Mami-Chouaib, J. Tabiasco, L. Boumsell et A. Bensussan. 2002. "Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity". Proc Natl Acad Sci U S A vol. 99, p. 16963-16968.
212. Nikolova, M., A. Marie-Cardine, L. Boumsell et A. Bensussan. 2002. "BY55/CD160 acts as a co-receptor in TCR signal transduction of a human circulating cytotoxic effector T lymphocyte subset lacking CD28 expression". Int Immunol vol. 14, p. 445-451.
213. Imai, T., H. Watanabe, T. Suda, H. Okamoto, T. Abo et K. Hatakeyama. 2002. "CD161+ T (NT) cells exist predominantly in human intestinal epithelium as well as in liver". Clin Exp Immunol vol. 129, p. 92-98.
214. Loza, M. J., L. S. Metelitsa et B. Perussia. 2002. "NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production". Eur J Immunol vol. 32, p. 3453-3462.
215. Speiser, D. E., M. Colonna, M. Ayyoub, M. Cella, M. J. Pittet, P. Batard, D. Valmori, P. Guillaume, D. Lienard, J. C. Cerottini et P. Romero. 2001. "The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8+ effector alpha beta T cells". J Immunol vol. 167, p. 6165-6170.
216. Ugolini, S., C. Arpin, N. Anfossi, T. Walzer, A. Cambiaggi, R. Forster, M. Lipp, R. E. Toes, C. J. Melief, J. Marvel et E. Vivier. 2001. "Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells". Nat Immunol vol. 2, p. 430-435.
217. Dhanji, S. et H. S. Teh. 2003. "IL-2-activated CD8+CD44high cells express both adaptive and innate immune system receptors and demonstrate specificity for syngeneic tumor cells". J Immunol vol. 171, p. 3442-3450.
218. Raulet, D. H. 2003. "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands". Nat Rev Immunol vol. 3, p. 781-790.

219. Fowlkes, B. J., A. M. Kruisbeek, H. Ton-That, M. A. Weston, J. E. Coligan, R. H. Schwartz et D. M. Pardoll. 1987. "A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family". Nature vol. 329, p. 251-254.
220. Zlotnik, A., D. I. Godfrey, M. Fischer et T. Suda. 1992. "Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4". J Immunol vol. 149, p. 1211-1215.
221. Arase, H., N. Arase, K. Nakagawa, R. A. Good et K. Onoe. 1993. "NK1.1+ CD4+ CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion". Eur J Immunol vol. 23, p. 307-310.
222. Bendelac, A., N. Killeen, D. R. Littman et R. H. Schwartz. 1994. "A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules". Science vol. 263, p. 1774-1778.
223. Bendelac, A., O. Lantz, M. E. Quimby, J. W. Yewdell, J. R. Bennink et R. R. Brutkiewicz. 1995. "CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes". Science vol. 268, p. 863-865.
224. Lantz, O. et A. Bendelac. 1994. "An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans". J Exp Med vol. 180, p. 1097-1106.
225. Dellabona, P., E. Padovan, G. Casorati, M. Brockhaus et A. Lanzavecchia. 1994. "An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells". J Exp Med vol. 180, p. 1171-1176.
226. Beckman, E. M., S. A. Porcelli, C. T. Morita, S. M. Behar, S. T. Furlong et M. B. Brenner. 1994. "Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells". Nature vol. 372, p. 691-694.

227. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki et M. Taniguchi. 1997. "CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides". Science vol. 278, p. 1626-1629.
228. Bendelac, A. 1995. "Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes". J Exp Med vol. 182, p. 2091-2096.
229. Coles, M. C. et D. H. Raulet. 2000. "NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells". J Immunol vol. 164, p. 2412-2418.
230. Sato, H., T. Nakayama, Y. Tanaka, M. Yamashita, Y. Shibata, E. Kondo, Y. Saito et M. Taniguchi. 1999. "Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature Valpha14 NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor". Proc Natl Acad Sci U S A vol. 96, p. 7439-7444.
231. Gapin, L., J. L. Matsuda, C. D. Surh et M. Kronenberg. 2001. "NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d". Nat Immunol vol. 2, p. 971-978.
232. MacDonald, H. R. 2002. "Development and selection of NKT cells". Curr Opin Immunol vol. 14, p. 250-254.
233. Benlagha, K., T. Kyin, A. Beavis, L. Teyton et A. Bendelac. 2002. "A thymic precursor to the NK T cell lineage". Science vol. 296, p. 553-555.
234. Pellicci, D. G., K. J. Hammond, A. P. Uldrich, A. G. Baxter, M. J. Smyth et D. I. Godfrey. 2002. "A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage". J Exp Med vol. 195, p. 835-844.
235. Godfrey, D. I., K. J. Hammond, L. D. Poulton, M. J. Smyth et A. G. Baxter. 2000. "NKT cells: facts, functions and fallacies". Immunol Today vol. 21, p. 573-583.
236. Cardell, S., S. Tangri, S. Chan, M. Kronenberg, C. Benoist et D. Mathis. 1995. "CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice". J Exp Med vol. 182, p. 993-1004.

237. Hammond, K. J., S. B. Pelikan, N. Y. Crowe, E. Randle-Barrett, T. Nakayama, M. Taniguchi, M. J. Smyth, I. R. van Driel, R. Scollay, A. G. Baxter et D. I. Godfrey. 1999. "NKT cells are phenotypically and functionally diverse". Eur J Immunol vol. 29, p. 3768-3781.
238. Gadue, P. et P. L. Stein. 2002. "NK T cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require Itk for efficient maturation". J Immunol vol. 169, p. 2397-2406.
239. Gumperz, J. E., S. Miyake, T. Yamamura et M. B. Brenner. 2002. "Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining". J Exp Med vol. 195, p. 625-636.
240. Lee, P. T., K. Benlagha, L. Teyton et A. Bendelac. 2002. "Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells". J Exp Med vol. 195, p. 637-641.
241. Smyth, M. J., N. Y. Crowe, Y. Hayakawa, K. Takeda, H. Yagita et D. I. Godfrey. 2002. "NKT cells - conductors of tumor immunity?" Curr Opin Immunol vol. 14, p. 165-171.
242. Cui, J., T. Shin, T. Kawano, H. Sato, E. Kondo, I. Taura, Y. Kaneko, H. Koseki, M. Kanno et M. Taniguchi. 1997. "Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors". Science vol. 278, p. 1623-1626.
243. Tomura, M., W. G. Yu, H. J. Ahn, M. Yamashita, Y. F. Yang, S. Ono, T. Hamaoka, T. Kawano, M. Taniguchi, Y. Koezuka et H. Fujiwara. 1999. "A novel function of Valpha14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system". J Immunol vol. 163, p. 93-101.
244. Gombert, J. M., A. Herbelin, E. Tancrede-Bohin, M. Dy, C. Carnaud et J. F. Bach. 1996. "Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse". Eur J Immunol vol. 26, p. 2989-2998.

245. Hammond, K. J., L. D. Poulton, L. J. Palmisano, P. A. Silveira, D. I. Godfrey et A. G. Baxter. 1998. "alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10". J Exp Med vol. 187, p. 1047-1056.
246. Lehuen, A., O. Lantz, L. Beaudoin, V. Laloux, C. Carnaud, A. Bendelac, J. F. Bach et R. C. Monteiro. 1998. "Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes". J Exp Med vol. 188, p. 1831-1839.
247. Hong, S., M. T. Wilson, I. Serizawa, L. Wu, N. Singh, O. V. Naidenko, T. Miura, T. Haba, D. C. Scherer, J. Wei, M. Kronenberg, Y. Koezuka et L. Van Kaer. 2001. "The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice". Nat Med vol. 7, p. 1052-1056.
248. Sharif, S., G. A. Arreaza, P. Zucker, Q. S. Mi, J. Sondhi, O. V. Naidenko, M. Kronenberg, Y. Koezuka, T. L. Delovitch, J. M. Gombert, M. Leite-De-Moraes, C. Gouarin, R. Zhu, A. Hameg, T. Nakayama, M. Taniguchi, F. Lepault, A. Lehuen, J. F. Bach et A. Herbelin. 2001. "Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes". Nat Med vol. 7, p. 1057-1062.
249. Wilson, S. B., S. C. Kent, K. T. Patton, T. Orban, R. A. Jackson, M. Exley, S. Porcelli, D. A. Schatz, M. A. Atkinson, S. P. Balk, J. L. Strominger et D. A. Hafler. 1998. "Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes". Nature vol. 391, p. 177-181.
250. Miyamoto, K., S. Miyake et T. Yamamura. 2001. "A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells". Nature vol. 413, p. 531-534.
251. Kumar, H., A. Belperron, S. W. Barthold et L. K. Bockenstedt. 2000. "Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*". J Immunol vol. 165, p. 4797-4801.

252. Kawakami, K., Y. Kinjo, S. Yara, Y. Koguchi, K. Uezu, T. Nakayama, M. Taniguchi et A. Saito. 2001. "Activation of Valpha14(+) natural killer T cells by alpha-galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans*". Infect Immun vol. 69, p. 213-220.
253. Kawakami, K., Y. Kinjo, S. Yara, K. Uezu, Y. Koguchi, M. Tohyama, M. Azuma, K. Takeda, S. Akira et A. Saito. 2001. "Enhanced gamma interferon production through activation of Valpha14(+) natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in interleukin-18-deficient mice with systemic cryptococcosis". Infect Immun vol. 69, p. 6643-6650.
254. Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth et L. Van Kaer. 2004. "NKT cells: what's in a name?" Nat Rev Immunol vol. 4, p. 231-237.
255. Vivier, E. 2003. "Tm1 cells, a subset of T cells with NK cell and memory CD8 T-cell features". Experimental Dermatology vol. 12, p. 915.
256. Ochi, H. et T. Watanabe. 2000. "Negative regulation of B cell receptor-mediated signaling in B-1 cells through CD5 and Ly49 co-receptors via Lyn kinase activity". Int Immunol vol. 12, p. 1417-1423.
257. Strauss, G., I. Knape, I. Melzner et K. M. Debatin. 2003. "Constitutive caspase activation and impaired death-inducing signaling complex formation in CD95-resistant, long-term activated, antigen-specific T cells". J Immunol vol. 171, p. 1172-1182.
258. Kornacker, M., M. R. Verneris, B. Kornacker, C. Scheffold et R. S. Negrin. 2001. "Survivin expression correlates with apoptosis resistance after lymphocyte activation and is found preferentially in memory T cells". Immunol Lett vol. 76, p. 169-173.
259. Grayson, J. M., A. J. Zajac, J. D. Altman et R. Ahmed. 2000. "Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cells". J Immunol vol. 164, p. 3950-3954.

260. Gati, A., N. Guerra, C. Gaudin, S. Da Rocha, B. Escudier, Y. Lecluse, A. Bettaieb, S. Chouaib et A. Caignard. 2003. "CD158 receptor controls cytotoxic T-lymphocyte susceptibility to tumor-mediated activation-induced cell death by interfering with Fas signaling". Cancer Res vol. 63, p. 7475-7482.
261. Crispe, I. N., T. Dao, K. Klugewitz, W. Z. Mehal et D. P. Metz. 2000. "The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field?" Immunol Rev vol. 174, p. 47-62.
262. Doherty, D. G., S. Norris, L. Madrigal-Estebas, G. McEntee, O. Traynor, J. E. Hegarty et C. O'Farrelly. 1999. "The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns". J Immunol vol. 163, p. 2314-2321.
263. Emoto, M., J. Zerrahn, M. Miyamoto, B. Perarnau et S. H. Kaufmann. 2000. "Phenotypic characterization of CD8(+)NKT cells". Eur J Immunol vol. 30, p. 2300-2311.
264. Yron, I., T. A. Wood, Jr., P. J. Spiess et S. A. Rosenberg. 1980. "In vitro growth of murine T cells. V. The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors". J Immunol vol. 125, p. 238-245.
265. Schmidt, R. E., C. Murray, J. F. Daley, S. F. Schlossman et J. Ritz. 1986. "A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype". J Exp Med vol. 164, p. 351-356.
266. Lotzova, E., C. A. Savary et R. B. Herberman. 1987. "Induction of NK cell activity against fresh human leukemia in culture with interleukin 2". J Immunol vol. 138, p. 2718-2727.
267. Schmidt-Wolf, I. G., R. S. Negrin, H. P. Kiem, K. G. Blume et I. L. Weissman. 1991. "Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity". J Exp Med vol. 174, p. 139-149.

268. Verneris, M. R., J. Baker, M. Edinger et R. S. Negrin. 2002. "Studies of ex vivo activated and expanded CD8+ NK-T cells in humans and mice". J Clin Immunol vol. 22, p. 131-136.
269. Verneris, M. R., M. Kornacker, V. Mailander et R. S. Negrin. 2000. "Resistance of ex vivo expanded CD3+CD56+ T cells to Fas-mediated apoptosis". Cancer Immunol Immunother vol. 49, p. 335-345.
270. Satoh, M., S. Seki, W. Hashimoto, K. Ogasawara, T. Kobayashi, K. Kumagai, S. Matsuno et K. Takeda. 1996. "Cytotoxic gammadelta or alphabeta T cells with a natural killer cell marker, CD56, induced from human peripheral blood lymphocytes by a combination of IL-12 and IL-2". J Immunol vol. 157, p. 3886-3892.
271. Lu, P. H. et R. S. Negrin. 1994. "A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency". J Immunol vol. 153, p. 1687-1696.
272. Gritzapis, A. D., D. Dimitroulopoulos, E. Paraskevas, C. N. Baxevanis et M. Papamichail. 2002. "Large-scale expansion of CD3(+)/CD56(+) lymphocytes capable of lysing autologous tumor cells with cytokine-rich supernatants". Cancer Immunol Immunother vol. 51, p. 440-448.
273. Schmidt-Wolf, I. G., P. Lefterova, V. Johnston, C. Scheffold, M. Csipai, B. A. Mehta, T. Tsuruo, D. Huhn et R. S. Negrin. 1996. "Sensitivity of multidrug-resistant tumor cell lines to immunologic effector cells". Cell Immunol vol. 169, p. 85-90.
274. Wang, F. S., M. X. Liu, B. Zhang, M. Shi, Z. Y. Lei, W. B. Sun, Q. Y. Du et J. M. Chen. 2002. "Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo". World J Gastroenterol vol. 8, p. 464-468.

275. Costello, R. T., S. Sivori, F. Mallet, D. Sainy, C. Arnoulet, D. Reviron, J. A. Gastaut, A. Moretta et D. Olive. 2002. "A novel mechanism of antitumor response involving the expansion of CD3+/CD56+ large granular lymphocytes triggered by a tumor-expressed activating ligand". Leukemia vol. 16, p. 855-860.
276. Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh et R. Ahmed. 2003. "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells". Nat Immunol vol. 4, p. 1191-1198.
277. Tomiyama, H., T. Matsuda et M. Takiguchi. 2002. "Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype". J Immunol vol. 168, p. 5538-5550.
278. Werwitzke, S., A. Tiede, B. E. Drescher, R. E. Schmidt et T. Witte. 2003. "CD8beta/CD28 expression defines functionally distinct populations of peripheral blood T lymphocytes". Clin Exp Immunol vol. 133, p. 334-343.
279. Assarsson, E., T. Kambayashi, J. K. Sandberg, S. Hong, M. Taniguchi, L. Van Kaer, H. G. Ljunggren et B. J. Chambers. 2000. "CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo". J Immunol vol. 165, p. 3673-3679.
280. Ikarashi, Y., H. Maruoka, K. Shinohara, T. Sugimura, M. Terada et H. Wakasugi. 1998. "Mouse NK1.1+ cytotoxic T cells can be generated by IL-2 exposure from lymphocytes which express an intermediate level of T cell receptor". Immunol Lett vol. 61, p. 165-173.
281. Alves, N. L., B. Hooibrink, F. A. Arosa et R. A. van Lier. 2003. "IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro". Blood vol. 102, p. 2541-2546.
282. Byers, A. M., C. C. Kemball, N. P. Andrews et A. E. Lukacher. 2003. "Regulation of antiviral CD8+ T cells by inhibitory natural killer cell receptors". Microbes Infect vol. 5, p. 169-177.

283. Mattei, F., G. Schiavoni, F. Belardelli et D. F. Tough. 2001. "IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation". J Immunol vol. 167, p. 1179-1187.
284. Saito, M., V. M. Braud, P. Goon, E. Hanon, G. P. Taylor, A. Saito, N. Eiraku, Y. Tanaka, K. Usuku, J. N. Weber, M. Osame et C. R. Bangham. 2003. "Low frequency of CD94/NKG2A+ T lymphocytes in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, but not in asymptomatic carriers". Blood vol. 102, p. 577-584.
285. Kambayashi, T., E. Assarsson, J. Michaelsson, P. Berglund, A. D. Diehl, B. J. Chambers et H. G. Ljunggren. 2000. "Emergence of CD8+ T cells expressing NK cell receptors in influenza A virus-infected mice". J Immunol vol. 165, p. 4964-4969.
286. McMahon, C. W. et D. H. Raulet. 2001. "Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells". Curr Opin Immunol vol. 13, p. 465-470.
287. Pauza, M., K. M. Smith, H. Neal, C. Reilly, L. L. Lanier et D. Lo. 2000. "Transgenic expression of Ly-49A in thymocytes alters repertoire selection". J Immunol vol. 164, p. 884-892.
288. Speiser, D. E., D. Valmori, D. Rimoldi, M. J. Pittet, D. Lienard, V. Cerundolo, H. R. MacDonald, J. C. Cerottini et P. Romero. 1999. "CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients". Eur J Immunol vol. 29, p. 1990-1999.
289. Ikeda, H., B. Lethe, F. Lehmann, N. van Baren, J. F. Baurain, C. de Smet, H. Chambost, M. Vitale, A. Moretta, T. Boon et P. G. Coulie. 1997. "Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor". Immunity vol. 6, p. 199-208.

290. Saurer, L., I. Seibold, C. Vallan, W. Held et C. Mueller. 2003. "Cutting edge: stimulation with the cognate self-antigen induces expression of the Ly49A receptor on self-reactive T cells which modulates their responsiveness". J Immunol vol. 171, p. 6334-6338.
291. De Maria, A., A. Ferraris, M. Guastella, S. Pilia, C. Cantoni, L. Polero, M. C. Mingari, D. Bassetti, A. S. Fauci et L. Moretta. 1997. "Expression of HLA class I-specific inhibitory natural killer cell receptors in HIV-specific cytolytic T lymphocytes: impairment of specific cytolytic functions". Proc Natl Acad Sci U S A vol. 94, p. 10285-10288.
292. Peacock, C. D., M. Y. Lin, J. R. Ortaldo et R. M. Welsh. 2000. "The virus-specific and allospecific cytotoxic T-lymphocyte response to lymphocytic choriomeningitis virus is modified in a subpopulation of CD8(+) T cells coexpressing the inhibitory major histocompatibility complex class I receptor Ly49G2". J Virol vol. 74, p. 7032-7038.
293. Moser, J. M., J. D. Altman et A. E. Lukacher. 2001. "Antiviral CD8+ T cell responses in neonatal mice: susceptibility to polyoma virus-induced tumors is associated with lack of cytotoxic function by viral antigen-specific T cells". J Exp Med vol. 193, p. 595-606.
294. King, C., A. Ilic, K. Koelsch et N. Sarvetnick. 2004. "Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity". Cell vol. 117, p. 265-277.
295. Konno, A., K. Okada, K. Mizuno, M. Nishida, S. Nagaoki, T. Toma, T. Uehara, K. Ohta, Y. Kasahara, H. Seki, A. Yachie et S. Koizumi. 2002. "CD8alpha alpha memory effector T cells descend directly from clonally expanded CD8alpha +beta high TCRalpha beta T cells in vivo". Blood vol. 100, p. 4090-4097.
296. Leishman, A. J., L. Gapin, M. Capone, E. Palmer, H. R. MacDonald, M. Kronenberg et H. Cheroutre. 2002. "Precursors of functional MHC class I- or class II-restricted CD8alphaalpha(+) T cells are positively selected in the thymus by agonist self-peptides". Immunity vol. 16, p. 355-364.

297. Yamagata, T., D. Mathis et C. Benoist. 2004. "Self-reactivity in thymic double-positive cells commits cells to a CD8 alpha alpha lineage with characteristics of innate immune cells". Nat Immunol vol. 5, p. 597-605.
298. Dhanji, S., S. J. Teh, D. Oble, J. J. Priatel et H. S. Teh. 2004. "Self-reactive memory-phenotype CD8 T cells exhibit both MHC-restricted and non-MHC-restricted cytotoxicity: a role for the T-cell receptor and natural killer cell receptors". Blood vol. 104, p. 2116-2123.
299. Yamada, H., G. Matsuzaki, Q. Chen, Y. Iwamoto et K. Nomoto. 2001. "Reevaluation of the origin of CD44(high) "memory phenotype" CD8 T cells: comparison between memory CD8 T cells and thymus-independent CD8 T cells". Eur J Immunol vol. 31, p. 1917-1926.
300. Yamada, H., T. Ninomiya, A. Hashimoto, K. Tamada, H. Takimoto et K. Nomoto. 1998. "Positive selection of extrathymically developed T cells by self-antigens". J Exp Med vol. 188, p. 779-784.
301. Kikly, K. et G. Dennert. 1992. "Evidence for extrathymic development of TNK cells. NK1+ CD3+ cells responsible for acute marrow graft rejection are present in thymus-deficient mice". J Immunol vol. 149, p. 403-412.
302. MacDonald, H. R. 1995. "NK1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells: new clues to their origin, specificity, and function". J Exp Med vol. 182, p. 633-638.
303. Sato, K., K. Ohtsuka, K. Hasegawa, S. Yamagiwa, H. Watanabe, H. Asakura et T. Abo. 1995. "Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation". J Exp Med vol. 182, p. 759-767.
304. Guy-Grand, D., O. Azogui, S. Celli, S. Darche, M. C. Nussenzweig, P. Kourilsky et P. Vassalli. 2003. "Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice". J Exp Med vol. 197, p. 333-341.

305. Maeda, M., A. Shadeo, A. M. MacFadyen et F. Takei. 2004. "CD1d-independent NKT cells in beta 2-microglobulin-deficient mice have hybrid phenotype and function of NK and T cells". J Immunol vol. 172, p. 6115-6122.
306. Moroda, T., T. Iiai, S. Suzuki, A. Tsukahara, T. Tada, M. Nose, K. Hatakeyama, S. Seki, K. Takeda, H. Watanabe et T. Abo. 1997. "Autologous killing by a population of intermediate T-cell receptor cells and its NK1.1+ and NK1.1- subsets, using Fas ligand/Fas molecules". Immunology vol. 91, p. 219-226.
307. Pido-Lopez, J., N. Imami et R. Aspinall. 2001. "Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age". Clin Exp Immunol vol. 125, p. 409-413.
308. Miyaji, C., H. Watanabe, H. Toma, M. Akisaka, K. Tomiyama, Y. Sato et T. Abo. 2000. "Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians". Hum Immunol vol. 61, p. 908-916.
309. Mocchegiani, E. et M. Malavolta. 2004. "NK and NKT cell functions in immunosenescence". Aging Cell vol. 3, p. 177-184.
310. Cookson, S. et D. Reen. 2003. "IL-15 drives neonatal T cells to acquire CD56 and become activated effector cells". Blood vol. 102, p. 2195-2197.
311. Ohkawa, T., S. Seki, H. Dobashi, Y. Koike, Y. Habu, K. Ami, H. Hiraide et I. Sekine. 2001. "Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells". Immunology vol. 103, p. 281-290.
312. Miyaji, C., H. Watanabe, M. Minagawa, H. Toma, T. Kawamura, Y. Nohara, H. Nozaki, Y. Sato et T. Abo. 1997. "Numerical and functional characteristics of lymphocyte subsets in centenarians". J Clin Immunol vol. 17, p. 420-429.

313. Takayama, E., Y. Koike, T. Ohkawa, T. Majima, M. Fukasawa, N. Shinomiya, T. Yamaguchi, M. Konishi, H. Hiraide, T. Tadakuma et S. Seki. 2003. "Functional and Vbeta repertoire characterization of human CD8+ T-cell subsets with natural killer cell markers, CD56+ CD57- T cells, CD56+ CD57+ T cells and CD56- CD57+ T cells". Immunology vol. 108, p. 211-219.
314. Exley, M., S. Porcelli, M. Furman, J. Garcia et S. Balk. 1998. "CD161 (NKR-P1A) costimulation of CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant V alpha 24 J alpha Q T cell receptor alpha chains". J Exp Med vol. 188, p. 867-876.
315. Madakamutil, L. T., U. Christen, C. J. Lena, Y. Wang-Zhu, A. Attinger, M. Sundarrajan, W. Ellmeier, M. G. von Herrath, P. Jensen, D. R. Littman et H. Cheroutre. 2004. "CD8alphaalpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors". Science vol. 304, p. 590-593.
316. Moebius, U., G. Kober, A. L. Griscelli, T. Hercend et S. C. Meuer. 1991. "Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations". Eur J Immunol vol. 21, p. 1793-1800.
317. Baume, D. M., M. A. Caligiuri, T. J. Manley, J. F. Daley et J. Ritz. 1990. "Differential expression of CD8 alpha and CD8 beta associated with MHC-restricted and non-MHC-restricted cytolytic effector cells". Cell Immunol vol. 131, p. 352-365.
318. Stievano, L., V. Tosello, N. Marcato, A. Rosato, A. Sebelin, L. Chieco-Bianchi et A. Amadori. 2003. "CD8+ alpha beta+ T cells that lack surface CD5 antigen expression are a major lymphotactin (XCL1) source in peripheral blood lymphocytes". J Immunol vol. 171, p. 4528-4538.
319. Arcaro, A., C. Gregoire, T. R. Bakker, L. Baldi, M. Jordan, L. Goffin, N. Boucheron, F. Wurm, P. A. van der Merwe, B. Malissen et I. F. Luescher. 2001. "CD8beta endows CD8 with efficient coreceptor function by coupling T cell receptor/CD3 to raft-associated CD8/p56(lck) complexes". J Exp Med vol. 194, p. 1485-1495.

320. Guy-Grand, D., M. Malassis-Seris, C. Briottet et P. Vassalli. 1991. "Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally. Correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts, and cytoplasmic granules". J Exp Med vol. 173, p. 1549-1552.
321. Ohwatari, R., K. Iwabuchi, C. Iwabuchi, T. Morohashi, H. Sawa, K. Hioki, K. Kobayashi, S. Fukuda, Y. Inuyama et K. Onoe. 2001. "Developmental and functional analyses of CD8(+) NK1.1(+) T cells in class-I-restricted TCR transgenic mice". Cell Immunol vol. 213, p. 24-33.
322. Zeromski, J., E. Nyczak et W. Dyszkiewicz. 2001. "Significance of cell adhesion molecules, CD56/NCAM in particular, in human tumor growth and spreading". Folia Histochem Cytobiol vol. 39 Suppl 2, p. 36-37.
323. Kenna, T., L. Golden-Mason, S. A. Porcelli, Y. Koezuka, J. E. Hegarty, C. O'Farrelly et D. G. Doherty. 2003. "NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells". J Immunol vol. 171, p. 1775-1779.
324. McQueen, K. L. et P. Parham. 2002. "Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells". Curr Opin Immunol vol. 14, p. 615-621.
325. Ryan, J. C., E. C. Niemi, M. C. Nakamura et W. E. Seaman. 1995. "NKR-P1A is a target-specific receptor that activates natural killer cell cytotoxicity". J Exp Med vol. 181, p. 1911-1915.
326. Wang, E. C. et L. K. Borysiewicz. 1995. "The role of CD8+, CD57+ cells in human cytomegalovirus and other viral infections". Scand J Infect Dis Suppl vol. 99, p. 69-77.
327. Hamann, D., M. T. Roos et R. A. van Lier. 1999. "Faces and phases of human CD8 T-cell development". Immunol Today vol. 20, p. 177-180.
328. Faouzi, S., B. E. Burckhardt, J. C. Hanson, C. B. Campe, L. W. Schrum, R. A. Rippe et J. J. Maher. 2001. "Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-kappa B-independent, caspase-3-dependent pathway". J Biol Chem vol. 276, p. 49077-49082.

329. Kataoka, T., R. C. Budd, N. Holler, M. Thome, F. Martinon, M. Imler, K. Burns, M. Hahne, N. Kennedy, M. Kovacsovics et J. Tschopp. 2000. "The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways". Curr Biol vol. 10, p. 640-648.
330. Ghosh, S. et M. Karin. 2002. "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle". Cell vol. 109 Suppl, p. S81-96.
331. Low, W., A. Smith, A. Ashworth et M. Collins. 1999. "JNK activation is not required for Fas-mediated apoptosis". Oncogene vol. 18, p. 3737-3741.
332. Catalfamo, M., T. Karpova, J. McNally, S. V. Costes, S. J. Lockett, E. Bos, P. J. Peters et P. A. Henkart. 2004. "Human CD8+ T cells store RANTES in a unique secretory compartment and release it rapidly after TcR stimulation". Immunity vol. 20, p. 219-230.
333. Smyth, M. J., J. M. Kelly, V. R. Sutton, J. E. Davis, K. A. Browne, T. J. Sayers et J. A. Trapani. 2001. "Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins". J Leukoc Biol vol. 70, p. 18-29.
334. Lavergne, E., C. Combadiere, M. Iga, A. Boissonnas, O. Bonduelle, M. Maho, P. Debre et B. Combadiere. 2004. "Intratumoral CC chemokine ligand 5 overexpression delays tumor growth and increases tumor cell infiltration". J Immunol vol. 173, p. 3755-3762.
335. Bensussan, A., C. Rabian, V. Schiavon, D. Bengoufa, G. Leca et L. Boumsell. 1993. "Significant enlargement of a specific subset of CD3+CD8+ peripheral blood leukocytes mediating cytotoxic T-lymphocyte activity during human immunodeficiency virus infection". Proc Natl Acad Sci U S A vol. 90, p. 9427-9430.
336. Peritt, D., D. A. Sesok-Pizzini, R. Schretzenmair, R. R. Macgregor, N. M. Valiante, X. Tu, G. Trinchieri et M. Kamoun. 1999. "C1.7 antigen expression on CD8+ T cells is activation dependent: increased proportion of C1.7+CD8+ T cells in HIV-1-infected patients with progressing disease". J Immunol vol. 162, p. 7563-7568.

337. Sasaki, Y., Y. Ami, T. Nakasone, K. Shinohara, E. Takahashi, S. Ando, K. Someya, Y. Suzaki et M. Honda. 2000. "Induction of CD95 ligand expression on T lymphocytes and B lymphocytes and its contribution to apoptosis of CD95-up-regulated CD4+ T lymphocytes in macaques by infection with a pathogenic simian/human immunodeficiency virus". Clin Exp Immunol vol. 122, p. 381-389.
338. Schmitz, J. E., M. A. Forman, M. A. Lifton, O. Concepcion, K. A. Reimann, Jr., C. S. Crumpacker, J. F. Daley, R. S. Gelman et N. L. Letvin. 1998. "Expression of the CD8alpha beta-heterodimer on CD8(+) T lymphocytes in peripheral blood lymphocytes of human immunodeficiency virus- and human immunodeficiency virus+ individuals". Blood vol. 92, p. 198-206.
339. Doherty, P. C., S. Hou et R. A. Tripp. 1994. "CD8+ T-cell memory to viruses". Curr Opin Immunol vol. 6, p. 545-552.
340. Hou, S., L. Hyland, K. W. Ryan, A. Portner et P. C. Doherty. 1994. "Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size". Nature vol. 369, p. 652-654.
341. Denkberg, G., C. J. Cohen et Y. Reiter. 2001. "Critical role for CD8 in binding of MHC tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR". J Immunol vol. 167, p. 270-276.
342. Jarry, A., N. Cerf-Bensussan, N. Brousse, F. Selz et D. Guy-Grand. 1990. "Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood". Eur J Immunol vol. 20, p. 1097-1103.
343. Boursier, J. P., A. Alcover, F. Herve, I. Laisney et O. Acuto. 1993. "Evidence for an extended structure of the T-cell co-receptor CD8 alpha as deduced from the hydrodynamic properties of soluble forms of the extracellular region". J Biol Chem vol. 268, p. 2013-2020.

344. Dransfield, I., C. Cabanas, A. Craig et N. Hogg. 1992. "Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1". J Cell Biol vol. 116, p. 219-226.
345. Leino, L. et K. Sorvajarvi. 1992. "CD11b is a calcium-dependent epitope in human neutrophils". Biochem Biophys Res Commun vol. 187, p. 195-200.
346. Bazzoni, G., L. Ma, M. L. Blue et M. E. Hemler. 1998. "Divalent cations and ligands induce conformational changes that are highly divergent among beta1 integrins". J Biol Chem vol. 273, p. 6670-6678.
347. Griffiths, E. K., C. Krawczyk, Y. Y. Kong, M. Raab, S. J. Hyduk, D. Bouchard, V. S. Chan, I. Kozieradzki, A. J. Oliveira-Dos-Santos, A. Wakeham, P. S. Ohashi, M. I. Cybulsky, C. E. Rudd et J. M. Penninger. 2001. "Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap". Science vol. 293, p. 2260-2263.
348. Peterson, E. J., M. L. Woods, S. A. Dmowski, G. Derimanov, M. S. Jordan, J. N. Wu, P. S. Myung, Q. H. Liu, J. T. Pribila, B. D. Freedman, Y. Shimizu et G. A. Koretzky. 2001. "Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb". Science vol. 293, p. 2263-2265.
349. Blue, M. L., D. A. Hafler, K. A. Craig, H. Levine et S. F. Schlossman. 1987. "Phosphorylation of CD4 and CD8 molecules following T cell triggering". J Immunol vol. 139, p. 3949-3954.
350. Acres, R. B., P. J. Conlon, D. Y. Mochizuki et B. Gallis. 1987. "Phosphorylation of the CD8 antigen on cytotoxic human T cells in response to phorbol myristate acetate or antigen-presenting B cells". J Immunol vol. 139, p. 2268-2274.
351. Devine, L., M. E. Hodsdon, M. A. Daniels, S. C. Jameson et P. B. Kavathas. 2004. "Location of the epitope for an anti-CD8alpha antibody 53.6.7 which enhances CD8alpha-MHC class I interaction indicates antibody stabilization of a higher affinity CD8 conformation". Immunol Lett vol. 93, p. 123-130.

352. Holman, P. O., E. R. Walsh et S. C. Jameson. 2005. "Characterizing the impact of CD8 antibodies on class I MHC multimer binding". J Immunol vol. 174, p. 3986-3991.
353. Wooldridge, L., S. L. Hutchinson, E. M. Choi, A. Lissina, E. Jones, F. Mirza, P. R. Dunbar, D. A. Price, V. Cerundolo et A. K. Sewell. 2003. "Anti-CD8 antibodies can inhibit or enhance peptide-MHC class I (pMHCI) multimer binding: this is paralleled by their effects on CTL activation and occurs in the absence of an interaction between pMHCI and CD8 on the cell surface". J Immunol vol. 171, p. 6650-6660.
354. Campanelli, R., B. Palermo, S. Garbelli, S. Mantovani, P. Lucchi, A. Necker, E. Lantelme et C. Giachino. 2002. "Human CD8 co-receptor is strictly involved in MHC-peptide tetramer-TCR binding and T cell activation". Int Immunol vol. 14, p. 39-44.
355. Lambert, C. et C. Genin. 2004. "CD3 bright lymphocyte population reveal gammadelta T cells". Cytometry vol. 61B, p. 45-53.
356. Watanabe, H., C. Miyaji, Y. Kawachi, T. Iiai, K. Ohtsuka, T. Iwanaga, H. Takahashi-Iwanaga et T. Abo. 1995. "Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1+ T cells in various immune organs. NK1.1+ T cells are present within a population of intermediate TCR cells". J Immunol vol. 155, p. 2972-2983.
357. Bix, M. et R. M. Locksley. 1995. "Natural T cells. Cells that co-express NKRP-1 and TCR". J Immunol vol. 155, p. 1020-1022.
358. Osman, Y., T. Watanabe, Y. Kawachi, K. Sato, K. Ohtsuka, H. Watanabe, S. Hashimoto, Y. Moriyama, A. Shibata et T. Abo. 1995. "Intermediate TCR cells with self-reactive clones are effector cells which induce syngeneic graft-versus-host disease in mice". Cell Immunol vol. 166, p. 172-186.
359. Jang, I. K. et H. Gu. 2003. "Negative regulation of TCR signaling and T-cell activation by selective protein degradation". Curr Opin Immunol vol. 15, p. 315-320.

360. Gunturi, A., R. E. Berg et J. Forman. 2003. "Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94". J Immunol vol. 170, p. 1737-1745.
361. Braud, V. M., D. S. Allan et A. J. McMichael. 1999. "Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules". Curr Opin Immunol vol. 11, p. 100-108.
362. Lutgendorf, S. K., M. B. Moore, S. Bradley, B. J. Shelton et C. T. Lutz. 2005. "Distress and expression of natural killer receptors on lymphocytes". Brain Behav Immun vol. 19, p. 185-194.
363. Rukavina, D., G. Laskarin, G. Rubesa, N. Strbo, I. Bedenicki, D. Manestar, M. Glavas, S. E. Christmas et E. R. Podack. 1998. "Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells". Blood vol. 92, p. 2410-2420.
364. Arlettaz, L., S. Degermann, C. De Rham, E. Roosnek et B. Huard. 2004. "Expression of inhibitory KIR is confined to CD8+ effector T cells and limits their proliferative capacity". Eur J Immunol vol. 34, p. 3413-3422.
365. Sansoni, P., A. Cossarizza, V. Brianti, F. Fagnoni, G. Snelli, D. Monti, A. Marcato, G. Passeri, C. Ortolani, E. Forti et et al. 1993. "Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians". Blood vol. 82, p. 2767-2773.
366. McNerlan, S. E., I. M. Rea, H. D. Alexander et T. C. Morris. 1998. "Changes in natural killer cells, the CD57CD8 subset, and related cytokines in healthy aging". J Clin Immunol vol. 18, p. 31-38.
367. Musha, N., Y. Yoshida, S. Sugahara, S. Yamagiwa, T. Koya, H. Watanabe, K. Hatakeyama et T. Abo. 1998. "Expansion of CD56+ NK T and gamma delta T cells from cord blood of human neonates". Clin Exp Immunol vol. 113, p. 220-228.
368. Nitta, T., M. Nakata, H. Yagita et K. Okumura. 1991. "Interleukin-2 activated T cells (T-LAK) express CD16 antigen and are triggered to target cell lysis by bispecific antibody". Immunol Lett vol. 28, p. 31-37.

369. Oshimi, K., Y. Oshimi, O. Yamada, M. Wada, T. Hara et H. Mizoguchi. 1990. "Cytotoxic T lymphocyte triggering via CD16 is regulated by CD3 and CD8 antigens. Studies with T cell receptor (TCR)-alpha beta+/CD3+16+ and TCR-gamma delta+/CD3+16+ granular lymphocytes". J Immunol vol. 144, p. 3312-3317.
370. Ricalton, N. S., C. Robertson, J. M. Norris, M. Rewers, R. F. Hamman et B. L. Kotzin. 1998. "Prevalence of CD8+ T-cell expansions in relation to age in healthy individuals". J Gerontol A Biol Sci Med Sci vol. 53, p. B196-203.
371. Obata-Onai, A., S. Hashimoto, N. Onai, M. Kurachi, S. Nagai, K. Shizuno, T. Nagahata et K. Matsushima. 2002. "Comprehensive gene expression analysis of human NK cells and CD8(+) T lymphocytes". Int Immunol vol. 14, p. 1085-1098.
372. Eberl, G. et D. R. Littman. 2004. "Thymic origin of intestinal alphabeta T Cells Revealed by Fate Mapping of RORgammat+ Cells". Science vol. 305, p. 248-251.
373. Guy-Grand, D. et P. Vassalli. 2004. "Immunology. Tracing an orphan's genealogy". Science vol. 305, p. 185-187.
374. Walzer, T., A. Marcais, F. Saltel, C. Bella, P. Jurdic et J. Marvel. 2003. "Cutting Edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation". J Immunol vol. 170, p. 1615-1619.
375. Faunce, D. E. et J. Stein-Streilein. 2002. "NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8+ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance." J Immunol vol. 169, p. 31-38.
376. Antunez, M. I. et R. L. Cardoni. 2004. "Trypanosoma cruzi: the expansion of NK, T, and NKT cells in the experimental infection". Exp Parasitol vol. 106, p. 85-94.
377. Adachi, K., H. Tsutsui, E. Seki, H. Nakano, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer et K. Nakanishi. 2004. "Contribution of CD1d-unrestricted hepatic DX5+ NKT cells to liver injury in Plasmodium berghei-parasitized erythrocyte-injected mice". Int Immunol vol. 16, p. 787-798.

378. Dean, J., D. McCarthy, M. Lawler, D. G. Doherty, C. O'Farrelly et L. Golden-Mason. 2005. "Characterization of NKR(+) T-cell subsets in human bone marrow: implications for immunosurveillance of neoplasia". Clin Immunol vol. 114, p. 42-51.
379. Shibolet, O., R. Alper, L. Zlotogarov, B. Thalenfeld, D. Engelhardt, E. Rabhani et Y. Ilan. 2004. "Suppression of hepatocellular carcinoma growth via oral immune regulation towards tumor-associated antigens is associated with increased NKT and CD8+ lymphocytes". Oncology vol. 66, p. 323-330.
380. Bach, J. F., A. Bendelac, M. B. Brenner, H. Cantor, G. De Libero, M. Kronenberg, L. L. Lanier, D. H. Raulet, M. J. Shlomchik et M. G. von Herrath. 2004. "The role of innate immunity in autoimmunity". J Exp Med vol. 200, p. 1527-1531.
381. Yoshimoto, T., A. Bendelac, J. Hu-Li et W. E. Paul. 1995. "Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4". Proc Natl Acad Sci U S A vol. 92, p. 11931-11934.
382. Sharif, S., G. A. Arreaza, P. Zucker, Q. S. Mi et T. L. Delovitch. 2002. "Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells". J Mol Med vol. 80, p. 290-300.
383. DiLorenzo, T. P., R. T. Graser, T. Ono, G. J. Christianson, H. D. Chapman, D. C. Roopenian, S. G. Nathenson et D. V. Serreze. 1998. "Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent T cell receptor alpha chain gene rearrangement". Proc Natl Acad Sci U S A vol. 95, p. 12538-12543.
384. Amrani, A., J. Verdaguer, P. Serra, S. Tafuro, R. Tan et P. Santamaria. 2000. "Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population". Nature vol. 406, p. 739-742.

385. Nagata, M., P. Santamaria, T. Kawamura, T. Utsugi et J. W. Yoon. 1994. "Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice". J Immunol vol. 152, p. 2042-2050.
386. Ogasawara, K., J. A. Hamerman, L. R. Ehrlich, H. Bour-Jordan, P. Santamaria, J. A. Bluestone et L. L. Lanier. 2004. "NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice". Immunity vol. 20, p. 757-767.
387. Abrahams, V. M., S. L. Straszewski-Chavez, S. Guller et G. Mor. 2004. "First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis". Mol Hum Reprod vol. 10, p. 55-63.
388. Mahmoud, F., A. Omu, H. Abul, S. El-Rayes et D. Haines. 2003. "Lymphocyte subpopulations in pregnancy complicated by hypertension". J Obstet Gynaecol vol. 23, p. 20-26.
389. Roychowdhury, S., K. F. May, Jr., K. S. Tzou, T. Lin, D. Bhatt, A. G. Freud, M. Guimond, A. K. Ferketich, Y. Liu et M. A. Caligiuri. 2004. "Failed adoptive immunotherapy with tumor-specific T cells: reversal with low-dose interleukin 15 but not low-dose interleukin 2". Cancer Res vol. 64, p. 8062-8067.
390. Li, H. F., Y. H. Yang, Y. J. Shi, Y. Q. Wang et P. Zhu. 2004. "Cytokine-induced killer cells showing multidrug resistance and remaining cytotoxic activity to tumor cells after transfected with mdr1 cDNA". Chin Med J (Engl) vol. 117, p. 1348-1352.
391. Ge, W., C. H. Li, W. Zhang, Q. Han, W. M. Deng, L. Chen, S. G. You et C. H. Zhao. 2004. "[Coculture of dendritic cell with cytokine-induced killer results in a significant increase in cytotoxic activity of CIK to tumor cells in vitro and in vivo]". Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi vol. 25, p. 277-280.
392. Visonneau, S., A. Cesano, D. L. Porter, S. L. Luger, L. Schuchter, M. Kamoun, M. H. Torosian, K. Duffy, C. Sickles, E. A. Stadtmauer et D. Santoli. 2000. "Phase I trial of TALL-104 cells in patients with refractory metastatic breast cancer". Clin Cancer Res vol. 6, p. 1744-1754.

393. Eco, U. 2000. "Comment voyager avec un saumon. Nouveaux pastiches et postiches". LGF ed., LGF, Paris, 283 pp.
394. Nietzsche, F. 1993. "Humain, trop Humain (1878-1879)". Robert Laffont ed., Paris, 1552 pp.