

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences et Technologies

THÈSE présentée par :

Jamila ELHMOUZI-YOUNES

Soutenue le : 11 Décembre 2009

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais**

Discipline - spécialité : Sciences de la vie et de la santé - Immunologie

Les cellules Natural Killer des ruminants
Première caractérisation des cellules Natural Killer
ovines et de bovin nouveau-né

THÈSE dirigée par :

Mme DROUET Françoise

Chargée de recherche, HDR, INRA, Tours

RAPPORTEURS :

M. FOUCRAS Gilles

Professeur, École Nationale Vétérinaire, Toulouse

M. SCOTT-ALGARA Daniel

Professeur associé, Docteur d'état, Institut Pasteur, Paris

JURY :

M. CHARLEY Bernard

Directeur de recherche, INRA, Jouy-en-Josas

Mme DIMIER-POISSON Isabelle

Professeur, université de Tours

Mme DROUET Françoise

Chargée de recherche, HDR, INRA, Tours

M. FOUCRAS Gilles

Professeur, École Nationale Vétérinaire, Toulouse

M. SCOTT-ALGARA Daniel

Professeur associé, Docteur d'état, Institut Pasteur, Paris

Mme STORSET Anne.K

Professeur, École vétérinaire d'Oslo, Norvège

À ma famille...

Mes très chers parents, pour tout ce qu'ils m'ont apporté, pour leur amour, leur soutien inconditionnel et pour m'avoir permis de suivre les études de mon choix jusqu'au bout. C'est grâce à vous que j'en suis arrivée là. Que ce travail vous soit entièrement dédié !

Mes frères et soeurs pour leur soutien et pour tous les sentiments forts qui nous lient.

Mon très cher mari pour son soutien, son écoute de tous les jours, son réconfort dans les moments d'incertitudes et sa patience surtout pendant la dernière année de thèse.

Mes beaux parents, pour leur gentillesse et qui, malgré la distance, m'ont toujours soutenue et encouragée.

...Toute ma reconnaissance et mes plus sincères remerciements.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes vifs remerciements à Fabrice Laurent et Françoise Drouet qui m'ont beaucoup apporté tout au long de cette thèse :

Fabrice, je te remercie pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe CIMEN. Merci pour tes conseils toujours très pertinents ainsi que pour ta disponibilité et les discussions scientifiques très enrichissantes qui m'ont permis d'approfondir mes réflexions scientifiques.

Françoise, je te remercie pour ta disponibilité, tes conseils et ton aide précieuse. Merci également pour ton soutien lors des difficultés rencontrées au début de ma thèse, tu as su me rassurer et m'épauler durant ces moments difficiles.

Enfin je vous remercie tout les deux, pour la confiance que vous m'avez toujours accordée et pour m'avoir laissé le choix lors de la réorientation de mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon jury, M Gilles Foucras et M Daniel Scott-Algara pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie sincèrement Mme Isabelle Dimier-Poisson pour avoir présidé cette thèse ainsi que Mme Anne Storset et M Bernard Charley pour avoir examiné ce travail.

Je remercie également Daniel Scott-Algara et Hervé Watier pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, pour leurs conseils et suggestions qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux de thèse.

Merci à Anne Marie Chaussé pour son aide et ses compétences lors de la production des anticorps monoclonaux. Je te remercie pour ta patience et pour le suivi de ce travail que tu as assuré d'une manière admirable. Je regrette les mal entendus qu'il y a eu à la fin de ce travail. C'est vraiment dommage...

Je remercie également Evelyne Esnault pour nous avoir aidée lors de la fusion ainsi que pour sa disponibilité et ses précieux conseils lors de la culture des hybridomes. Merci également à Jean François Vautherot pour sa disponibilité et ses conseils minutieux en culture cellulaire.

Thank you very much to Anne Storset and Preben Boysen, our Norwegian colleagues. It was a real pleasure to collaborate with you. Thanks to you, I learnt a lot on Natural Killer cells. Your good mood and your optimism helped me to be poised and made my stay in Norway very pleasant. Thank you for your interpersonal and scientific skills.

Je tiens également à remercier les animaliers de la PFIE : Robert Gélinau, Delphine Serreau, Thierry Chaumeil et Michel Maillon pour les prélèvements de sang qu'ils ont effectués sur les veaux, les vaches et les moutons, sans lesquels ces travaux n'auraient pu être faits.

Merci également au service commun de cytométrie en flux et en particulier à Yves Le Vern pour sa disponibilité et pour les séances de tri qu'il nous a accordées. Je le remercie également pour sa bonne humeur, son humour et ses précieux conseils en cytométrie.

Merci à Daniela Pende pour nous avoir fourni l'anticorps anti-CD16, qui nous a permis de réaliser le deuxième article. J'espère qu'en publiant cet article nous l'avons convaincue de commercialiser son anticorps. Cela rendra la suite des travaux beaucoup moins contraignante...

Je tiens également à remercier Sonia, pour sa sympathie et ses compétences en biologie moléculaire, notamment en PCR quantitative. Malgré ton emploi du temps très chargé, tu as toujours été disponible pour répondre à mes questions et grâce à toi, j'ai beaucoup appris sur cette technique.

Je remercie également Roselyne et Nelly, pour leur sympathie, leur disponibilité, leur bonne humeur et leur soutien qui ont contribué à rendre mes trois années de thèse très agréables. Merci à Muriel et Geneviève pour leur gentillesse au quotidien et leur disponibilité. Je remercie également Stéphanie pour sa sympathie, ses conseils et les discussions que nous avons pu avoir, non seulement sur nos expériences antérieures mais également sur la recherche d'emploi, qui m'ont beaucoup apporté. Steph, je te remercie également pour tes compétences en cytométrie en flux (comme dirait Fabrice « tu es l'experte en cytométrie ») et également pour ton anglais que tu maîtrises à la perfection après avoir passé 3 ans à YORK! Merci également à Amandine, ça m'a fait plaisir de faire ta connaissance, j'ai apprécié les discussions qu'on a pu avoir (on se comprenait entre thésardes...), je te souhaite toute la réussite possible pour ta nouvelle thèse. Aude, je te remercie pour ta fraîcheur, ta bonne humeur et ta gentillesse et te souhaite également de réussir dans ta thèse (mais je ne m'inquiète pas pour toi...). Coralie et Louis, même si au final je ne vous aurai vus que pendant quelques mois, je retiendrai votre sympathie et votre motivation. Coralie je te souhaite une bonne continuation dans ton travail et Louis, toute la réussite pour ta thèse.

Je remercie également Claire et Christelle, pour leur sympathie et pour m'avoir motivée à m'inscrire aux cours de tennis. J'ai vraiment apprécié les cours et les parties en dehors des cours. Merci également à l'ensemble de l'équipe IMAV et l'équipe RVP pour les pots que nous avons partagés, leur humour, leur sympathie et leurs conseils.

Enfin, un petit clin d'oeil aux personnes que j'ai croisées pendant mes trois années de thèse : Iciar, Isabel, Gael, Sylvana, Audrey, Marbel...

Résumé

Les nouveau-nés, dont le système immunitaire adaptatif est encore en développement sont souvent plus sensibles aux infections que les adultes. L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes et en particulier les cellules Natural Killer (NK), via leur fonction cytotoxique et leur production d'interféron-gamma (IFN- γ).

Dans le but de pouvoir étudier, à terme, l'implication des cellules NK des ovins nouveau-nés dans un contexte infectieux, nous avons mis en place une stratégie permettant d'isoler et de caractériser ces cellules pour la première fois. En attendant que cette méthode soit mise au point, nous avons recherché les particularités des cellules NK des nouveau-nés chez les bovins pour lesquels un anticorps dirigé contre le récepteur NKp46 spécifique des cellules NK est disponible.

Nous avons observé que, bien que moins nombreuses dans le sang périphérique, les cellules NK des nouveau-nés prolifèrent rapidement, sont totalement fonctionnelles et répondent fortement (cytotoxicité et production d'IFN- γ) après culture en présence d'IL-15 et lors de la stimulation du récepteur NKp46 (Elhmouzi-Younes et al., 2009b). Nous avons pu caractériser les cellules NK ovines, parmi les cellules mononuclées du sang périphérique, en mettant en place une méthode basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre le marqueur CD14, spécifique des monocytes, et le récepteur CD16 exprimé par les cellules NK et les monocytes. Les cellules CD16⁺/CD14⁻ présentent toutes les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles fondamentales des cellules NK (Elhmouzi-Younes et al., 2009a).

Mots clés : cellule NK / bovin / ovin / cytotoxicité / IFN- γ / interleukine

Résumé en anglais

Neonates are often more susceptible to infections than adults, due to their adaptive immune system still in development. Natural Killer (NK) cells are key cells of the innate immune system which provide early resistance to infections through their cytotoxic properties and production of interferon-gamma (IFN- γ).

In order to study the involvement of NK cells from ovine neonates during an infection we developed, a method to isolate and characterize these cells for the first time. While this method was developed, we investigated the peculiarities of bovine neonate NK cells as an antibody directed against the NKp46 receptor specific of bovine NK cells is available.

On the one hand, we found that although less numerous in peripheral blood, neonate NK cells proliferated actively, were totally functional and highly responsive (cytotoxicity and IFN- γ production) to IL-15 and to NKp46 receptor stimulation (Elh mouzi-Younes et al., 2009b). On the other hand, we characterized ovine NK cells, among peripheral blood mononuclear cells, after developing a strategy based on the use of antibodies against the CD14 marker, specific of monocytes, and the CD16 receptor expressed by NK cells and monocytes. We found that CD16⁺/CD14⁻ cells present all the morphological, phenotypical and functional characteristics of NK cells (Elh mouzi-Younes et al., 2009a).

Key words: NK cells / bovine / ovine / cytotoxicity / IFN- γ / interleukin

Table des matières

Introduction	16
Contexte bibliographique	19
Chapitre I : Le système immunitaire	20
I- Organisation générale du système immunitaire.....	20
II- Immunité adaptative	21
1- Génération des lymphocytes T auxiliaires.....	22
2- Génération des lymphocytes T cytotoxiques.....	23
III- Immunité innée.....	23
1- Les barrières naturelles.....	24
2- Les médiateurs de l'inflammation	24
3- Les récepteurs de l'immunité innée.....	26
IV- Lien entre immunité innée et adaptative.....	26
V- Particularités du système immunitaire foetal et néonatal	29
1- Immunité foetale.....	29
2- Immunité néonatale.....	30
Chapitre II : Les cellules Natural Killer humaines et murines	33
I- Découverte et caractéristiques	33
II- Critères phénotypiques permettant de définir les cellules NK	34
III- Les récepteurs des cellules NK.....	35
1- Les récepteurs inhibiteurs	36
2- Les récepteurs activateurs.....	38
IV- Ontogenèse et circulation des cellules NK.....	41
1- Ontogenèse des cellules NK et maturation.....	41
2- Répartition et migration des cellules NK dans les différents compartiments de l'organisme.....	42
V- Activité des cellules NK.....	43
1- « Éducation » et activation des cellules NK	43
2- Fonction des cellules NK et mécanismes d'activation	45
VI- Importance des cellules NK dans la réponse immunitaire anti-infectieuse et anti-tumorale	53
1- Réponse anti-infectieuse	53

2-	Réponse anti-tumorale	56
VII-	Particularités des cellules NK utérines.....	56
VIII-	Particularités des cellules NK néonatales.....	59
1-	Particularités phénotypiques et fonctionnelles.....	59
2-	Importance des cellules NK dans les défenses anti-infectieuses chez le nouveau-né	60
Chapitre III : Les cellules Natural Killer des animaux domestiques		61
I-	Généralités	61
II-	Les cellules NK bovines – comparaison avec les cellules NK humaines et murines.....	61
1-	Les cellules NK bovines sont NKp46 ⁺ /CD3 ⁻	61
2-	Les récepteurs des cellules NK bovines.....	62
3-	Sous populations de cellules NK bovines.....	63
4-	Numération des cellules NK bovines dans le sang périphérique.	64
5-	Répartition des cellules NK dans les tissus	65
6-	Rôle des cellules NK bovines dans la réponse anti-infectieuse	66
III-	Les cellules NK des petits ruminants.....	67
Objectifs		68
Résultats – Articles.....		71
I-	Particularité des cellules Natural Killer des bovins nouveau-nés.....	72
	Article 1	72
II-	Caractérisation des cellules Natural Killer des petits ruminants.....	88
	Travaux non publiés	88
➤	Test d'anticorps commerciaux	89
➤	Production d'anticorps monoclonaux	91
1-	Stratégie générale.....	91
2-	Production de la protéine caprine recombinante soluble NKp46-Fc	92
3-	Immunisation des souris et analyse de la présence d'anticorps dans le sérum des souris	95
4-	Obtention d'hybridomes produisant des anticorps anti-NKp46.....	98
	Article 2.....	105
Discussion générale et perspectives		122
I-	Importance des cytokines utilisées pour stimuler les cellules NK	123
II-	Définitions et fonctions alternatives des cellules NK.....	127

1- Les cellules NK d'une espèce donnée peuvent-elles toutes être définies par un seul marqueur ?	127
2- La fixation d'anticorps à des récepteurs activateurs induit-elle toujours une activation des cellules NK ?.....	129
III- Perspectives d'études du rôle des cellules NK dans un contexte infectieux....	131
Références bibliographiques	134
Annexes.....	150
Liste des travaux.....	158

Liste des tableaux

Tableau I. Principaux récepteurs exprimés par les cellules NK humaines et murines. ..	37
Tableau II. Les récepteurs Toll Like (TLR) exprimés par les cellules NK humaines	40
Tableau III. Principales cytokines impliquées dans l'activation des cellules NK.	45
Tableau IV. Récepteurs identifiés au niveau des cellules NK bovines.	63
Tableau V. Anticorps anti-NKp46 humains et anti-NKp46 de rat testés pour leurs réactions croisées avec les PBMC caprins et ovins.....	91

Liste des figures

Figure 1. Cellule Natural Killer du sang périphérique humain, colorée au May-Grünwald-Giemsa.....	34
Figure 2. Développement des cellules NK.....	41
Figure 3. Régulation de la migration des cellules NK par les chimiokines.....	43
Figure 4. Mécanismes d'activation des cellules NK (Théorie du « Missing self »).....	47
Figure 5. Mécanismes de cytotoxicité des cellules NK.....	48
Figure 6. Interaction entre les cellules NK et les cellules dendritiques dans les organes périphériques.....	51
Figure 7. Interaction entre les cellules NK, les lymphocytes T et les cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques.....	52
Figure 8. Les cellules NK assurent une réponse précoce lors d'infections virales.....	54
Figure 9. Molécules exprimées par les cellules NK utérines (uNK) et les cellules NK CD56 ^{bright} du sang périphérique.....	58
Figure 10. Alignement des séquences protéiques de la partie extracellulaire du récepteur NKp46 caprin et bovin.....	90
Figure 11. Transfection cellulaire permettant l'expression de la protéine recombinante NKp46-Fc.....	92
Figure 12. Les différentes étapes pour l'immunoprécipitation à la protéine A.....	93
Figure 13. Résultat du western blot réalisé après immunoprécipitation à la protéine A.....	94
Figure 14. Résultat du western blot et de la coloration au nitrate d'argent réalisés après purification de la protéine sur colonne HPLC.....	95
Figure 15. Protocole d'immunisation des souris Balb/c.....	96
Figure 16. Transfection cellulaire permettant l'expression de la protéine recombinante NKp46-FLAG.....	97
Figure 17. Marquage des cellules transfectées avec le sérum de souris et analyse par cytométrie en flux.....	97
Figure 18. Vérification de la présence d'anticorps anti-NKp46 dans le sérum de la souris par western blot.....	98
Figure 19. Transfection cellulaire permettant l'expression d'une protéine recombinante témoin.....	99
Figure 20. Criblage des hybridomes sur cellules transfectées par cytométrie en flux.....	100
Figure 21. Criblage des hybridomes sur des cellules NKp46 ⁺ bovines par cytométrie en flux.....	101

Figure 22. Criblage de l'hybridome BD3 sur cellules transfectées et cellules NK bovines par western blot.....	101
Figure 23. Criblage des sous-clones sur cellules transfectées avec le plasmide p3XFLAG-NKp46-Ca par cytométrie en flux.....	102
Figure 24. Détermination de l'isotype des anticorps issus du sous-clonage de DA5.....	103
Figure 25. Criblage des anticorps issus du sous-clonage de DA5 sur des PBMC par cytométrie en flux.....	104
Figure 26. Analyse de la réaction croisée de l'anticorps anti-CD16 humain (clone KD1) avec les PBMC bovins, ovins et caprins par cytométrie en flux.	106
Figure 27. Mesure de la prolifération des cellules NK bovines cultivées en présence d'IL-2 ou en présence d'IL-15.....	124
Figure 28. Analyse par immunofluorescence des cellules MDBK infectées <i>in-vitro</i> par <i>C. parvum</i>.	131
Figure 29. Lyse directe des cellules MDBK infectées par <i>C. parvum</i> par les cellules NK d'un même veau.....	132
Figure 30. Lyse directe des lignées bovines MDBK, EBRT ou MacT (non infectées), par les cellules NK d'un même veau.....	132

Liste des annexes

Annexe 1 : Composition des tampons.....	151
Annexe 2 : Conditions de culture des cellules.....	152
Annexe 3 : Les étapes du western blot.....	153
Annexe 4 : Purification, dialyse et concentration de la protéine recombinante.....	155
Annexe 5 : Obtention des hybridomes.....	157

Liste des abréviations

ADCC : Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
BCR : B-Cell Receptor
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
CSF-1 : Colony Stimulating Factor 1
CTL : Cytotoxic T Lymphocytes
FAM : Function-Associated Molecule
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HAT : Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine
HGPRT : Hypoxanthine-guanidine phosphoribosyl-transférase
HLA : Human Leucocyte Antigen
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
IFN- γ : Interferon-gamma
IKDC : Interferon-producing Killer Dendritic Cells
Ig : Immunoglobulines
IL : Interleukine
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
KAR : Killer activating receptor
KIR : Killer Immunoglobulin-like receptor
LAK : Lymphokine-Activated Killer
LCMV : Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LGL : Large Granular Lymphocyte
LIF : Leukemia inhibitory factor
LRC : Leucocyte Receptor Complexe
MCMV : Murine Cytomegalovirus
MDBK : Madin Darby Bovine Kidney
MDV : Marek Disease Virus
MICA/B : MHC class I-related chain A and B
NK : Natural Killer
NCR : Natural Cytotoxicity Receptor

NKC : Natural Killer gene Complex
NKDC : Natural Killer Dendritic Cells
NLR : Nod-Like Receptors
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBL : Peripheral Blood Lymphocytes
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PEG : Polyéthylène glycol
PLGF : Placental Growth Factor
PRR : Pattern Recognition Receptor
TCR : T-Cell Receptor
TGF : Transforming Growth Factor
TLR : Toll-Like Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor-Alpha
TRAIL : Tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Introduction

La période néonatale est caractérisée par une grande sensibilité aux infections. Cette plus grande vulnérabilité des nouveau-nés est attribuée à une relative immaturité de leur système immunitaire encore en développement. Dans le cas d'infections survenant dès les premiers jours suivant la naissance, lorsque l'immunité transmise par la mère est peu efficace, la vaccination est peu envisageable et la seule alternative est la stimulation des défenses innées. C'est l'option retenue par le laboratoire pour contrôler la cryptosporidiose, une maladie zoonotique causée par le parasite protozoaire *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) qui est aujourd'hui en France, la première cause d'entérites diarrhéiques du veau nouveau-né et dont la prévalence est élevée chez tous les ruminants (veaux, agneaux, chevreaux). Il n'existe à ce jour qu'un seul traitement prophylactique, l'Halocur™, mais qui nécessite des administrations répétées pour pouvoir réduire le niveau de l'infection. Afin de pouvoir développer de nouvelles stratégies d'immunoprophylaxie adaptées à la cryptosporidiose nous étudions les mécanismes naturels mis en jeu lors de la réponse immunitaire précoce ainsi que les spécificités du système immunitaire néonatal qui pourraient être exploitées ou compensées par des approches d'immunostimulation. Les travaux sur le modèle murin de différentes équipes dont notre laboratoire montrent que le développement d'une réponse immunitaire de type Th1 est nécessaire au contrôle de l'infection (Lacroix-Lamande et al., 2002; McDonald, 2000). Les cytokines comme l'IFN- γ et l'IL-12 jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'infection. Parmi les cellules de l'immunité innée, les cellules Natural Killer (NK) sont bien connues pour produire rapidement des quantités importantes d'IFN- γ et ont aussi la capacité de lyser les cellules infectées par cytotoxicité naturelle ou médiée par les anticorps (ADCC pour *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*). Les travaux de F. Drouet dans notre laboratoire ont montré que la production d'IFN- γ dans la muqueuse intestinale de rats nouveau-nés infectés par *C. parvum* est probablement due en grande partie aux cellules NK, population lymphocytaire dominante dans la muqueuse intestinale à cet âge. D'autres travaux montrent l'importance des cellules NK dans des modèles de souris déficientes (Barakat et al., 2009). D'autre part on sait aujourd'hui que les cellules NK par leurs interactions avec les cellules dendritiques peuvent moduler le développement de la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1. Les cellules NK sont donc des acteurs clés du système immunitaire puisqu'elles sont à la fois des cellules effectrices du système immunitaire inné et qu'elles constituent un lien entre l'immunité innée et adaptative.

La majorité des études portant sur les cellules NK ont été faites chez l'Homme et les rongeurs. Chez les autres espèces, peu d'études ont été faites faute d'anticorps spécifiques disponibles

(Evans and Jaso-Friedmann, 1993; Gerner et al., 2009; Gobel et al., 1994; Tekin and Hansen, 2002). Chez les bovins, la génération d'un anticorps (commercialisé en 2006), dirigé contre un récepteur activateur spécifique des cellules NK, le récepteur NKp46, a permis une avancée importante des connaissances sur les cellules NK bovines (Boysen and Storset, 2009; Storset et al., 2004). Chez les petits ruminants (caprins et ovins), en absence d'anticorps spécifique très peu d'études ont été faites et les quelques publications disponibles ne décrivent que la présence de cellules « NK-like » ovines dans le sang et la muqueuse utérine. Jusqu'à présent, les cellules NK des petits ruminants n'avaient jamais été isolées et caractérisées. Pour des raisons de coût, en particulier lorsque les animaux doivent être abattus, les petits ruminants servent souvent de modèle pour étudier les maladies infectieuses qui touchent les bovins. Bien qu'à terme l'objectif soit une meilleure connaissance du système immunitaire mucosal des ruminants, pour des raisons pratiques et économiques nous avons choisi de caractériser, dans un premier temps les cellules NK sanguines.

Au cours de cette thèse, notre objectif a donc été de contribuer à l'apport de nouvelles données sur la biologie des cellules NK des ruminants. Dans un premier temps, alors que nous essayions de développer des anticorps monoclonaux spécifiques des cellules NK de petits ruminants nous avons parallèlement étudié les caractéristiques des cellules NKp46⁺ des veaux nouveau-nés. Ce travail a été publié dans la revue « Veterinary Research » (Article 1). Nous avons ensuite trouvé une méthode pour isoler et caractériser pour la première fois les cellules NK des ovins, publiée dans la revue « Veterinary Research » (Article 2) ouvrant ainsi la possibilité de pouvoir étudier l'importance des cellules NK intestinales dans le contrôle de maladies comme la cryptosporidiose.

Contexte bibliographique

Chapitre I : Le système immunitaire

I- Organisation générale du système immunitaire

Le système immunitaire est un ensemble de cellules, d'organes et de tissus qui ont pour fonction de défendre l'organisme contre les agents pathogènes tels que les virus, les bactéries, les parasites, les cellules cancéreuses, certaines particules ou molécules étrangères et de manière plus générale contre les agressions du milieu extérieur. Le système immunitaire de l'Homme et des vertébrés supérieurs repose sur l'immunité adaptative ou spécifique et sur l'immunité innée ou non spécifique. La réponse adaptative qui met en jeu les lymphocytes T et B, présente une cinétique de réponse lente mais est douée de mémoire. La réponse innée, à laquelle participent de nombreuses cellules hématopoïétiques telles que les polynucléaires, les macrophages, les mastocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes Natural Killer (NK) et des cellules épithéliales et stromales, se déclenche rapidement et, sauf quelques exceptions récemment décrites (Ugolini and Vivier, 2009), ne possède pas de mémoire. L'ensemble des cellules du système immunitaire sont issues d'organes lymphoïdes primaires ou centraux: elles sont toutes générées dans la moelle osseuse et les lymphocytes T périphériques finissent leur maturation dans le thymus. Les organes ou tissus lymphoïdes secondaires ou périphériques regroupent la rate, les ganglions lymphatiques et mésentériques et les formations lymphoïdes associées aux muqueuses telles que les plaques de Peyer, les amygdales, l'appendice iléo-cæcal, les formations lymphoïdes respiratoires et des formations lymphoïdes tissulaires. Ils constituent le lieu de passage, d'accumulation, et de rencontre des antigènes et des cellules de l'immunité et permettent ainsi le développement et l'amplification de la réponse immunitaire.

Le principe de la réponse immunitaire repose sur la distinction entre les antigènes du « soi », c'est à dire l'ensemble des molécules propres à l'individu, et les antigènes du « non soi » c'est à dire les molécules étrangères à l'individu. En effet, toutes les cellules nucléées de l'organisme expriment à leur surface un ensemble de molécules spécifiques, constituant les marqueurs du soi ou Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) qui, chez l'Homme, correspondent aux antigènes des leucocytes humains (HLA pour *Human Leucocyte Antigen*). Les mécanismes permettant aux cellules immunitaires de faire la distinction entre les

molécules du soi et les molécules étrangères à l'organisme diffèrent selon qu'elles appartiennent au système immunitaire adaptatif ou au système inné.

II- Immunité adaptative

La recherche en immunologie a été dominée au cours des dernières décennies par les travaux portant sur la compréhension des mécanismes de l'immunité adaptative, et des progrès spectaculaires ont été accomplis (Janeway, 2001). Les cellules responsables de la réponse immunitaire adaptative sont les lymphocytes T et B qui expriment des récepteurs membranaires spécifiques d'un antigène donné dans le cas du *T-Cell Receptor* (TCR) et du *B-Cell Receptor* (BCR), ou solubles dans le cas des Immunoglobulines (Ig) produites par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes. Dans un organisme donné on peut trouver jusqu'à plusieurs milliards de lymphocytes présentant une spécificité antigénique unique, conséquence de la recombinaison somatique des gènes codant pour ces récepteurs. Lorsqu'un corps étranger pénètre dans l'organisme, la réponse immunitaire va se développer et aboutir à l'expansion clonale des lymphocytes portant le récepteur spécifique pour l'antigène étranger donné. Certains lymphocytes deviendront des lymphocytes mémoires qui permettront la mise en place d'une réponse immunitaire plus rapide lors d'un nouveau contact avec le même agent pathogène. Le système immunitaire adaptatif permet donc à chaque individu d'avoir un ensemble unique de récepteurs aux antigènes correspondant à l'environnement avec lequel il est en contact tout au long de sa vie.

L'immunité adaptative présente deux composantes : l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. Lors d'une réponse immunitaire, le type de réponse va dépendre de l'agent pathogène impliqué. Les agents pathogènes envahissant le compartiment extracellulaire vont plutôt déclencher une réponse immunitaire à médiation humorale : ils vont être reconnus par les récepteurs BCR spécifiques ce qui va conduire à l'activation des lymphocytes B et à leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'Ig solubles. La réponse immunitaire à médiation cellulaire est plutôt déclenchée par les agents pathogènes intracellulaires : les récepteurs TCR spécifiques reconnaissent l'antigène présenté par le CMH à la surface des Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA), ce qui va aboutir à l'expansion clonale des lymphocytes T et à leur différenciation en lymphocytes T auxiliaires ou « helper » (Th) ou en lymphocytes T cytotoxiques (CTL pour *Cytotoxic T Lymphocytes*).

1- Génération des lymphocytes T auxiliaires

Les lymphocytes T auxiliaires ou Th sont générés suite à l'interaction du TCR des lymphocytes CD4⁺ avec le complexe « CMH de classe II / déterminant antigénique » et ont pour fonction de stimuler d'autres cellules effectrices. En fonction de l'environnement cytokinique dans lequel se fait la réponse immunitaire, deux types de lymphocytes Th peuvent être générés. Lorsque l'environnement est riche en interleukine-12 (IL-12), la différenciation se fait en lymphocytes de type Th1. Lorsque les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont rapidement en contact avec de l'interleukine-4 (IL-4) et en l'absence d'IL-12, ils se différencient en lymphocytes de type Th2. Cette polarisation Th1 ou Th2 va orienter la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes Th1 sécrètent des cytokines telles que l'interleukine-2, -3 (IL-2, IL-3), l'interféron-gamma (IFN- γ), les *Tumor Necrosis Factor-Alpha et Beta* (TNF- α et β) qui d'une part vont agir - via l'IFN- γ - en inhibant l'action des lymphocytes Th2 et d'autre part, vont favoriser le développement de la réponse immunitaire cellulaire. Au contraire, les lymphocytes Th2 sécrètent des cytokines telles que l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 qui vont d'une part inhiber - via l'IL-4 - l'action des lymphocytes Th1 et d'autre part favoriser le développement de la réponse immunitaire humorale (Romagnani, 1991, 1997). Plus récemment un nouveau cas de polarisation à partir des lymphocytes T CD4⁺ naïfs a été mis en évidence dépendant également des cytokines présentes dans le microenvironnement. En présence d'IL-6 et de TGF- β (pour Transforming Growth Factor-beta), les lymphocytes T CD4⁺ naïfs se différencient en lymphocytes « pathologiques » Th17, nommés ainsi car initialement connus comme étant les seules cellules pouvant produire de l'IL-17, cytokine ayant un rôle pro-inflammatoire et impliquée dans l'induction des maladies auto-immunes (Acosta-Rodriguez et al., 2007a; Acosta-Rodriguez et al., 2007b; Annunziato et al., 2007 ; Park et al., 2005). Cependant, récemment une sous population de lymphocytes T CD8⁺ capables de produire de l'IL-17 (nommés Tc17), a été mise en évidence ; comme pour les Th17, la différenciation des lymphocytes Tc17 se fait en fonction de l'environnement cytokinique et notamment en présence d'IL-23 (Curtis et al., 2009) ; elle serait également fonction de l'absence d'expression de facteurs de transcription T-bet et eomesodermin (Intlekofer et al., 2008). De plus, ces cellules sont également considérées comme étant des lymphocytes « pathologiques » ne produisant pas ou que très peu d'IFN- γ et ayant une activité cytotoxique réduite. En effet, des souris déficientes pour T-bet et eomesodermin, infectées par

le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) présentent des titres élevés de virus, corrélés à la présence de lymphocytes Tc17 (Intlekofer et al., 2008).

Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent également se différencier en lymphocytes T régulateurs (Treg) ayant un rôle anti-inflammatoire et protecteur contre les maladies auto-immunes (Afzali et al., 2007; Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). Cette différenciation se fait en absence d'IL-6 mais en présence de TGF- β .

2- Génération des lymphocytes T cytotoxiques

Les lymphocytes T cytotoxiques qui se différencient suite à l'interaction des lymphocytes T CD8⁺ avec le complexe « CMH de classe I / déterminant antigénique », ont pour fonction de lyser les cellules infectées. La lyse peut faire intervenir plusieurs molécules : le mécanisme le plus puissant et le plus rapide est la libération de granules cytotoxiques constitués de molécules de perforine et de granzymes (Trapani and Smyth, 2002). La perforine va s'insérer dans la membrane de la cellule cible, y créer des pores et permettre l'entrée des granzymes dans la cellule. Les granzymes sont des protéases qui vont cliver de nombreux substrats dans la cellule cible et conduire à sa mort.

Un second mécanisme plus lent (plusieurs heures) et souvent moins efficace que la lyse par les molécules de perforine et de granzymes met en jeu la protéine FasL exprimée à la surface des CTL qui va se fixer sur un récepteur Fas situé à la surface de la cellule cible. La liaison de FasL à Fas va déclencher un programme intracellulaire conduisant à l'apoptose de la cellule cible. Enfin, un troisième mécanisme fait intervenir le TNF sécrété par le CTL. Celui-ci va se fixer sur un récepteur au TNF ce qui va conduire aux mêmes types de conséquences que l'interaction FasL/Fas. Dans tous les cas, la cellule cible meurt par apoptose.

III- Immunité innée

Malgré sa très grande spécificité, le système immunitaire adaptatif ne permet pas à lui seul de contrôler les infections. En effet, l'amplification clonale des lymphocytes naïfs et leur différenciation en cellules effectrices prennent quelques jours, alors que de nombreux agents infectieux ont des temps de génération qui peuvent n'être que de quelques dizaines de minutes. En fait, chez tous les êtres vivants, l'invasion par des micro-organismes est

initialement combattue par des mécanismes de défense innés qui préexistent et qui sont activés dans les minutes qui suivent l'infection. Le système immunitaire inné est constitué de cellules dont les récepteurs ne sont pas produits par recombinaison somatique mais, sont codés par la lignée germinale. Ce système est généralement décrit comme étant un système primitif qui constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Néanmoins, en plus de son action immédiate contre les agents pathogènes, il est aujourd'hui clairement démontré que les cellules de l'immunité innée sont également essentielles à l'activation de la réponse immunitaire adaptative.

1- Les barrières naturelles

Tous les êtres vivants possèdent des barrières et des substances naturelles qui empêchent les infections par les micro-organismes. La peau et les muqueuses agissent comme des **barrières physiques**. Il existe également des **barrières chimiques et biochimiques** qui correspondent essentiellement à des enzymes protéolytiques présentes dans les sucs digestifs qui ont le pouvoir de détruire certains des micro-organismes envahisseurs. Lorsque les micro-organismes arrivent à passer ces barrières, ils sont immédiatement pris en charge par des molécules et des cellules immunitaires qui vont interagir et provoquer une réaction inflammatoire permettant un contrôle rapide de l'infection.

2- Les médiateurs de l'inflammation

Parmi les agents intervenant dans la réaction inflammatoire, nous trouvons des médiateurs solubles et des médiateurs cellulaires.

2-1- Les médiateurs solubles

Les médiateurs solubles peuvent être présents soit sous forme inactive avant toute lésion tissulaire, cette dernière ne faisant que les activer, ou être synthétisés par différentes populations cellulaires. Ces médiateurs solubles comprennent des protéases plasmatiques notamment celles du système du complément qui, après contact soit avec des complexes anticorps/antigènes soit directement avec l'agent pathogène, s'activent en cascade. Les médiateurs solubles comprennent également des médiateurs lipidiques, différents peptides et

amines tels que l'histamine et la sérotonine et enfin, des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α et l'IFN- γ produites par différents médiateurs cellulaires.

2-2- Les médiateurs cellulaires

a- Les cellules résidentes

Les médiateurs cellulaires comprennent des cellules présentes sur le site d'inflammation dites « cellules résidentes » telles que les mastocytes et les macrophages (Katsanos et al., 2008 ; Martinez et al., 2008). Les **mastocytes** sont des cellules granuleuses qui vont libérer des médiateurs solubles tels que l'histamine et la sérotonine. Les **macrophages** sont des cellules phagocytaires qui ont pour fonction de capturer les micro-organismes, de les détruire et de présenter à leur surface les antigènes microbiens couplés aux molécules de CMH de classe II. Les complexes CMH/déterminant antigénique seront reconnus par les lymphocytes T, ce qui va entraîner leur activation et déclencher la réponse immunitaire adaptative. Parallèlement à ce phénomène, le macrophage activé est capable de sécréter des cytokines qui vont stimuler les cellules de l'immunité adaptative et des chimiokines pro-inflammatoires qui vont notamment contribuer au recrutement de cellules inflammatoires circulantes telles que les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les monocytes, les plaquettes et les lymphocytes (NK, T et B).

b- Les cellules recrutées au niveau des sites d'inflammation

Parmi les leucocytes polynucléaires sanguins, **les neutrophiles** font partie des premières cellules recrutées au niveau du site lésé. A ce niveau elles vont avoir une fonction de phagocytose suivie par la libération de granules contenant des substances anti-microbiennes et par la production de formes réactives de l'oxygène à partir des anions superoxydes (O_2^-), l'ensemble de ces événements favorisant l'élimination de l'agent pathogène. **Les éosinophiles et les basophiles** sanguins possèdent des granules renfermant des substances vasodilatatrices et toxiques ; lorsqu'elles sont libérées au niveau du site d'inflammation, ces substances provoquent des réponses inflammatoires rapides et peuvent rapidement détruire des micro-organismes extracellulaires. **Les monocytes** recrutés dans les tissus lésés deviennent des macrophages activés capables de phagocyter les agents pathogènes et de produire des protéines anti-bactériennes et des médiateurs pro-inflammatoires. **Les plaquettes sanguines**

contribuent au processus inflammatoire par la libération de nombreux médiateurs incluant le fibrinogène, le plasminogène et des protéases plasmatiques ainsi que de la sérotonine. Enfin, **les lymphocytes NK** sont les cellules cytotoxiques de l'immunité innée ; elles vont contribuer à l'élimination des cellules infectées et à l'activation des cellules de l'immunité adaptative via la production de cytokines. Leurs propriétés sont détaillées dans le chapitre II (page 33).

3- Les récepteurs de l'immunité innée

La plupart des cellules du système immunitaire inné expriment des récepteurs appelés «*Pattern-Recognition Receptors*» (PRR) qui reconnaissent le « non-soi microbien » c'est à dire des molécules aux motifs structuraux très conservés présents sur l'enveloppe des micro-organismes mais absents des cellules eucaryotes. Ces structures sont appelées « *Pathogen-Associated Molecular Patterns* » (PAMP). Les PRR sont présents sous plusieurs formes : sécrétés, intracellulaires ou membranaires. Les plus connus sont les « *Toll-Like Receptors* » (TLR) qui sont généralement membranaires, et les récepteurs « *Nod-Like Receptors* » (NLR) qui sont intracellulaires. L'activation de ces récepteurs aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires via l'induction de la voie de signalisation NFκB. Outre les PRR, il existe d'autres récepteurs qui sont capables de détecter l'absence du soi ou de détecter la présence de marqueurs anormaux du soi induits après infection ou transformation. Ces récepteurs sont des récepteurs inhibiteurs qui sont essentiellement exprimés par les cellules Natural Killer et seront décrits dans le chapitre dédié à ces cellules (page 36).

IV- Lien entre immunité innée et adaptative

Certaines cellules constituent un lien entre immunité innée et immunité adaptative. Les lymphocytes NKT et les lymphocytes T-γδ possèdent à la fois des caractéristiques de cellules de l'immunité innée et de cellules de l'immunité adaptative. Les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules NK, bien que faisant partie du système immunité inné, peuvent moduler la réponse immunitaire adaptative.

- Les **lymphocytes NKT** forment un sous-ensemble de lymphocytes T qui expriment à la fois des récepteurs des cellules NK et des récepteurs des lymphocytes T. Le TCR qu'ils expriment est particulier puisqu'il va reconnaître des antigènes glycolipidiques couplés aux molécules

CD1d (dites molécules du CMH non conventionnelles) qui sont exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigène, ce qui va entraîner leur activation. Comme les cellules NK, ils peuvent également être activés par l'IL-12 produite par les cellules dendritiques. Leur activation se traduit par la sécrétion de cytokines impliquées dans l'activation des lymphocytes Th1 (IFN- γ) et Th2 (IL-4 et IL-13) (Terabe and Berzofsky, 2008; Van Kaer, 2007). De plus, l'expression des molécules CD1d serait importante lors de la génération et du développement des lymphocytes NKT. En effet, des souris déficientes en CD1d ne présentent pas de lymphocytes NKT matures (Chen et al., 1997; Gapin et al., 2001). Une étude a montré que chez les ruminants, le gène codant pour CD1d présente des mutations empêchant la production de protéines fonctionnelles et en ont déduit que les ruminants seraient par conséquent dépourvus de lymphocytes NKT (Looringh van Beeck et al., 2009).

- Les **lymphocytes T- $\gamma\delta$** sont des cellules qui possèdent à la fois des caractéristiques des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Comme les lymphocytes T et B, ils expriment des récepteurs de reconnaissance antigénique qui sont produits par réarrangement des gènes qui les codent. Leur appellation ($\gamma\delta$) fait référence aux types de chaînes qui constituent leur TCR. Cependant, comme les cellules de l'immunité innée, ils peuvent s'activer sans contact préalable avec l'agent pathogène et sont également capables de reconnaître les antigènes microbiens natifs c'est à dire non présentés par les molécules du CMH. Leur activation se traduit par une activité cytotoxique et par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α qui vont contribuer à une orientation Th1 de la réponse immunitaire adaptative (Beetz et al., 2008).

- Les principales **cellules présentatrices d'antigène** sont les macrophages et les cellules dendritiques. Ce sont les cellules sentinelles typiques de l'immunité innée car elles sont distribuées stratégiquement dans tous les tissus. Elles expriment des récepteurs PRR capables de se lier à des motifs conservés à la surface des micro-organismes (PAMP). Une fois que le micro-organisme est reconnu, il est internalisé, dégradé puis associé aux molécules de CMH de classe II pour être présenté à la surface cellulaire. Ce phénomène de présentation de l'antigène se situe à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative puisque le complexe CMH/antigène reconnu par les lymphocytes T CD4⁺ entraîne leur activation et le développement de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules dendritiques sont dites cellules présentatrices d'antigènes « professionnelles » car ce sont les seules qui sont capables

de déclencher une réponse primaire des lymphocytes T CD8⁺. En effet, les cellules dendritiques sont présentes en périphérie sous forme immature ; elles ont la capacité de capturer l'antigène, de le dégrader et de le présenter couplé aux molécules de CMH de classe I (phénomène de « cross-présentation »). Par la suite, elles sont capables de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et ainsi de rencontrer et d'activer les lymphocytes T CD8⁺ naïfs ce qui va initier la réponse immunitaire adaptative. En plus de ce rôle, les cellules dendritiques peuvent interagir avec les cellules NK.

- **Les cellules NK** sont les cellules cytotoxiques du système immunitaire inné ; elles sont recrutées à la fois au niveau du site d'inflammation et des ganglions où elles vont d'une part jouer leur rôle de cellules cytotoxiques et d'autre part avoir une fonction régulatrice sur la réponse immunitaire adaptative via la sécrétion de cytokines et le contact avec d'autres types cellulaires incluant les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Della Chiesa et al., 2005). Cet aspect sera décrit plus en détail dans le chapitre consacré aux cellules NK (page 50).

- Récemment deux autres types de cellules ont été décrits chez la souris. Ces cellules nommées *interferon-producing killer dendritic cells (IKDC)* et *Natural killer Dendritic Cells (NKDC)* semblent en fait représenter la même population cellulaire. Elles ont à la fois la fonction de présentation d'antigènes des cellules dendritiques et les fonctions effectrices (cytotoxicité et production d'IFN- γ) des cellules NK et ont été décrites comme étant des cellules qui constituent un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Chan et al., 2006; Pillarisetty et al., 2005; Taieb et al., 2006). Ces cellules sont maintenant considérées comme constituant un sous-ensemble de cellules NK plutôt qu'un sous-ensemble de cellules dendritiques (Blasius et al., 2007; Caminschi et al., 2007) mais leur intervention lors de la réponse immunitaire n'a pas encore été clairement définie.

V- Particularités du système immunitaire foetal et néonatal

1- Immunité foetale

Durant la gestation, le système immunitaire du foetus est en plein développement. Cette période est associée à des changements immunologiques chez la mère et au niveau de l'interface foeto-maternelle qui permettent le maintien de la gestation et affectent également le développement du foetus. Ces changements correspondent notamment à la mise en place de mécanismes complexes qui entraînent l'inhibition des lymphocytes Th1 ayant une fonction pro-inflammatoire et l'amplification de la fonction des lymphocytes Th2 qui ont un effet immunosuppresseur (Wegmann et al., 1993). Au début de la gestation, une couche de cellules embryonnaires nommée trophoblaste se différencie et permet l'implantation de l'embryon dans la muqueuse utérine puis le développement fœtal. Les cellules du trophoblaste expriment faiblement le récepteur Fas ce qui leur confère une résistance à l'apoptose Fas-dépendante. En revanche, elles sont capables de produire des molécules de FasL solubles, ce qui conduit à l'apoptose des lymphocytes T maternels activés exprimant Fas, ce qui permet une protection du foetus contre les fonctions cytotoxiques de ces lymphocytes (Abrahams et al., 2004; Guller and LaChapelle, 1999). De plus, parmi les lymphocytes utérins, les cellules NK sont les plus abondantes (70% des lymphocytes) et sont directement en contact avec les cellules du trophoblaste (Manaster and Mandelboim, 2008). Les cellules NK utérines sont différentes des cellules NK du sang périphérique (leurs particularités sont détaillées dans le chapitre consacré aux cellules NK page 56). Les fonctions effectrices des cellules NK utérines sont dépendantes de l'engagement des récepteurs activateurs de cytotoxicité naturelle (NCR) mais sont inhibées via l'engagement du récepteur inhibiteur NKG2A avec le ligand HLA-E exprimé par les cellules du trophoblaste (El Costa et al., 2009), ce qui permet de maintenir l'intégrité des cellules du trophoblaste.

Chez l'Homme, le système immunitaire foetal est maintenu dans un état de latence. En effet, le sang de cordon renferme une grande quantité de lymphocytes T régulateurs ayant une fonction immunosuppressive (Godfrey et al., 2005; Thornton et al., 2004; Wing et al., 2005) associée notamment à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T foetaux (Michaelsson et al., 2006). Néanmoins le foetus serait tout de même capable de répondre partiellement face à un agent étranger : en effet, à 15-16 semaines de gestation, les lymphocytes ont la capacité de répondre à une stimulation par la phytohémagglutinine, mais le degré de réponse du

système immunitaire foetal face à ce stimulus n'a pas été clairement défini (Szepfalusi, 2008). Chez l'Homme et les rongeurs, (contrairement aux ruminants, au porc et au cheval), le foetus acquiert une certaine immunité passive via le passage transplacentaire des IgG maternelles. Toutefois, le placenta est imperméable aux immunoglobulines ayant des structures de polymères (IgA, IgM et IgE); c'est pourquoi leur présence dans le sang du foetus ou du nouveau-né traduit une synthèse propre *in utero*. En effet, il a été montré que la vaccination de femmes enceintes entraîne l'apparition d'IgM dans la circulation foetale indiquant une réponse active du système immunitaire foetal. Ces données suggèrent que le système immunitaire du foetus est partiellement fonctionnel avant la naissance.

2- Immunité néonatale

À la naissance, le foetus change soudainement d'environnement en passant du milieu intra-utérin protégé et physiologiquement stérile au milieu extérieur où les micro-organismes bénéfiques et pathogènes co-existent : la peau et le tractus intestinal sont rapidement colonisés par cette flore microbienne et sont caractérisés par une surexpression des molécules de l'immunité innée avec notamment, au niveau de la peau, une sécrétion de composés antimicrobiens et au niveau de l'intestin une expression de TLR2 et TLR4 fonctionnels (Levy, 2007).

Bien que les composants du système immunitaire adaptatif soient présents à la naissance, ils sont souvent dans un état naïf ou quiescent. La majorité des études portant sur l'immunité du nouveau-né montrent un déficit de la réponse immunitaire adaptative avec notamment une déficience dans la présentation antigénique par les cellules dendritiques (Ridge et al., 1996), une expression suboptimale des molécules de costimulation par les lymphocytes T et une immaturité fonctionnelle des monocytes (Han et al., 2004). En 1997, Comans-Bitter *et al.*, ont analysé l'évolution de la proportion des différentes populations lymphocytaires présentes dans le sang de cordon et dans le sang périphérique de nouveau-nés, d'enfants et d'adultes. Le nombre absolu de lymphocytes B immatures et de lymphocytes T CD4⁺ augmente immédiatement après la naissance et jusqu'à l'âge de 2 ans avant de décroître progressivement jusqu'à l'âge adulte alors que le nombre de lymphocytes T CD8⁺ demeure stable de la naissance à l'âge de 2 ans avant de décroître progressivement jusqu'à l'âge adulte. Contrairement aux lymphocytes T et B, le nombre absolu de cellules NK est élevé dans le

sang de cordon et décroît pendant les deux mois qui suivent la naissance puis demeure relativement stable jusqu'à l'âge adulte (Comans-Bitter et al., 1997). Ces évolutions ont également été décrites par d'autres auteurs (O'Gorman et al., 1998; Sundstrom et al., 2007). Chez l'Homme, le nombre total de lymphocytes dans le sang périphérique est plus important durant la petite enfance qu'à l'âge adulte mais les lymphocytes T des nouveau-nés ont le phénotype de thymocytes ou de lymphocytes $CD4^+CD8^+$ ce qui révèle également une certaine immaturité de leur immunité adaptative (Calado et al., 1999; de Vries et al., 2000 ; Hannet et al., 1992).

De nombreuses maladies de l'enfance telles que la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite sont contrôlées par des vaccins. Cependant, les enfants vaccinés très tôt, durant la première année de vie, ont une réponse anticorps primaire qui est généralement faible et insuffisante ce qui implique des rappels pour obtenir une protection correcte. Néanmoins, dans le cas de la tuberculose, l'immunisation des nouveau-nés avec le BCG entraîne une réponse immunitaire adaptative (anticorps et Th1) du même degré que celle observée chez les adultes. Ces données montrent que le système immunitaire adaptatif des nouveau-nés est capable de fonctionner de façon optimale mais que cela dépend de l'agent pathogène et des conditions d'exposition à cet agent (Adkins et al., 2004).

En plus de la protection acquise par la stimulation de leur propre système immunitaire, les nouveau-nés bénéficient d'une protection maternelle passive via l'absorption des composants immunitaires présents dans le lait. Celui-ci contient notamment des molécules de l'immunité innée telles que des protéines et des peptides antimicrobiens, des molécules anti-bactériennes (la lactoferrine et le lysozyme), des cellules et des facteurs anti-inflammatoires tels que le TGF- β et l'IL-10 (Hosea Blewett et al., 2008). Il contient également des molécules de l'immunité adaptative telles que les anticorps : le colostrum qui est sécrété les premiers jours suivant la naissance en est particulièrement riche. Cependant, le type d'anticorps majoritairement retrouvé varie entre les espèces ; par exemple, le colostrum humain est riche en IgA alors que le colostrum de vache est riche en IgG1 (Stelwagen et al., 2009). Le colostrum contient également des cytokines pro-inflammatoires qui seraient impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires au niveau de l'intestin et des cytokines anti-inflammatoires qui inhiberaient la sécrétion locale de cytokines pro-inflammatoires au niveau de l'intestin du nouveau-né ce qui favoriserait la colonisation microbienne. Chez les

ruminants, le cheval et le porc, l'absorption de colostrum est particulièrement importante pour le nouveau-né puisque c'est la seule protection passive qu'il reçoive.

Chapitre II : Les cellules Natural Killer humaines et murines

I- Découverte et caractéristiques

Les cellules NK ont été découvertes chez l'Homme et la souris au début des années 1970 sur des critères fonctionnels correspondant à leur aptitude à lyser certaines cellules tumorales en l'absence de stimulation préalable (Hokland and Kuppen, 2005) d'où leur dénomination de « tueuses naturelles ». Par la suite leur définition s'est précisée ; elles ont été décrites comme de grands lymphocytes granuleux (LGL pour *Large Granular Lymphocytes*) (**figure 1**) dont les gènes codant pour les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes restent en configuration germinale (Lanier et al., 1986) contrairement aux lymphocytes T et B dont les gènes des récepteurs de reconnaissance antigénique subissent diverses recombinaisons. Au début des années 1980 une attention particulière leur a été consacrée (Timonen et al., 1979) avec notamment, la formulation de l'hypothèse du « soi manquant » («missing self») par Klas Kärre (Karre, 2002, 2008), basée sur le fait que les cellules NK sont capables de détecter et de lyser des cellules qui ont perdu l'expression des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) (Karre et al., 1986; Ljunggren and Karre, 1985). Dans les années 1990, plusieurs études ont permis la mise en évidence de récepteurs exprimés par les cellules NK tels que les récepteurs activateurs et inhibiteurs (Bakker et al., 1998; Lanier, 1998). Les propriétés fonctionnelles des cellules NK ont également été mises en évidence telles que la cytotoxicité dans la réponse immunitaire contre certains virus, parasites et bactéries intra-cellulaires (Biron et al., 1999; Scott and Trinchieri, 1995; Unanue, 1997) et la sécrétion de cytokines telle que l'IFN- γ . Aujourd'hui, les cellules NK sont considérées comme étant des acteurs clés, non seulement dans la réponse immunitaire innée anti-infectieuse, mais également dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative de par les cytokines qu'elles produisent et via l'interaction avec d'autres cellules de l'immunité telles que les cellules dendritiques.



Figure 1. Cellule Natural Killer du sang périphérique humain, colorée au May-Grünwald-Giemsa.

(Fenneteau et al., 2006)

II- Critères phénotypiques permettant de définir les cellules NK

À la fin des années 1980, les cellules NK ont été définies phénotypiquement comme étant des lymphocytes CD3⁻ et TCR⁻.

- Chez l'Homme, elles expriment les marqueurs CD56 et CD16 (FcγRIIIA) (Hercend and Schmidt, 1988; Ritz et al., 1988). Chez des espèces proches de l'Homme comme le babouin ou le macaque rhésus, le marqueur CD56 n'est pas exprimé ou n'est exprimé que par un sous-ensemble de cellules NK. Chez l'Homme également, la présence de cellules NK CD56⁻/CD16⁺ a été décrite chez des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Mavilio et al., 2005), mais cette population est minoritaire chez des individus sains, c'est pourquoi, le marqueur CD56 est considéré comme le marqueur type des cellules NK humaines. En fonction de leur phénotype, au moins 48 sous-populations de cellules NK humaines ont été décrites (Jonges et al., 2001), mais actuellement on considère seulement deux grandes sous-populations en lien avec leurs propriétés fonctionnelles : les cellules NK dites « cytotoxiques » CD56^{dim}/CD16⁺ majoritaires dans le sang périphérique et les cellules NK dites « productrices de cytokines » CD56^{bright}/CD16⁻, moins nombreuses dans le sang mais présentes en plus grande quantité dans les tissus lymphoïdes secondaires (Fan et al., 2008; Farag and Caligiuri, 2006; Ferlazzo et al., 2004).

- Chez la souris, les cellules NK n'expriment pas le marqueur CD56 et l'équivalent des populations de cellules NK humaines n'a pas été clairement décrit (Colucci et al., 2003). Les cellules NK murines ont été initialement identifiées comme des cellules exprimant le marqueur NK1.1 (NKR-P1C). Néanmoins, ce marqueur n'étant pas exprimé chez toutes les lignées de souris, le marqueur CD49b (DX5) a ensuite été adopté (Arase et al., 2001).

- Chez le rat, le marqueur le plus commun, utilisé pour identifier les cellules NK est NKR-P1 (Giorda et al., 1990).

- Aujourd'hui, chez de nombreuses espèces telles que l'Homme, la souris, le rat, le singe, les bovins (Walzer et al., 2007a) et depuis peu le porc (Bolzer, K. Communication affichée, congrès EVIW, 2009), les cellules NK sont décrites comme étant NKp46⁺/CD3⁻. Le marqueur NKp46 (CD335) a été découvert en 1997 sur des lymphocytes humains par l'équipe de Moretta et a été décrit comme étant exclusivement exprimé par les cellules NK (Sivori et al., 1997). Par la suite, les homologues du récepteur NKp46 humain ont également été identifiés chez la souris, le rat, le singe et les bovins, (Bianconi et al., 1999; De Maria et al., 2001; Falco et al., 1999; Storset et al., 2003) et retrouvés seulement sur les cellules NK. En conséquence, le récepteur NKp46 a été proposé comme étant le plus adapté pour définir les cellules NK quelle que soit l'espèce. NKp46 (CD335) est un récepteur activateur qui, avec les récepteurs NKp44 (CD336) et NKp30 (CD337) également exprimés à la surface des cellules NK, appartient à la famille des récepteurs NCR (pour *Natural Cytotoxicity Receptor*). Le ligand de ces récepteurs semble être exprimé à la surface des cellules tumorales ou par des virus et correspondrait à des séquences d'héparane / héparine sulfate (Hecht et al., 2009).

III- Les récepteurs des cellules NK

Le **tableau I** présente un ensemble non exhaustif, de récepteurs exprimés par les cellules NK. La majorité des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK appartiennent à deux catégories. La première correspond aux récepteurs appartenant à la super-famille des Immunoglobulines (Immunoglobulin-like) ; ils sont codés par des gènes regroupés en clusters LRC (pour *Leucocyte Receptor Complex*) situés sur le chromosome 19 chez l'Homme et sur le chromosome 7 chez la souris (Canavez et al., 2001; Hoelsbrekken et al., 2003). La seconde catégorie correspond aux récepteurs de type C-lectine. Ces récepteurs sont codés par des

gènes regroupés en clusters NKC (pour *Natural Killer gene Complex*) situés au niveau du chromosome 12 chez l'Homme et du chromosome 6 chez la souris (Brown et al., 1997; Renedo et al., 1997). Ces deux catégories de récepteurs regroupent à la fois des récepteurs activateurs et inhibiteurs. Les autres catégories de récepteurs sont impliquées dans l'activation ou la migration des cellules NK. Notons que dans l'organisme, les cellules NK n'expriment pas toutes simultanément le même répertoire de récepteurs.

1- Les récepteurs inhibiteurs

Les récepteurs inhibiteurs reconnaissent les molécules de CMH de classe I et sont impliqués dans le mécanisme du « *missing-self* » que nous avons évoqué précédemment (page 33). Ceux-ci comprennent des récepteurs « *Killer Immunoglobulin-like receptors* » (KIR) chez l'Homme et les primates, les récepteurs Ly49 de type C-lectine chez les rongeurs et les récepteurs hétérodimériques CD94/NKG2 également de type C-lectine qui sont conservés chez la majorité des espèces (O'Connor et al., 2006; Sambrook et al., 2005). Les récepteurs KIR/Ly49 reconnaissent les molécules de CMH de classe I « classiques » et les récepteurs CD94/NKG2A reconnaissent les molécules du CMH « non classique » dits CMH de classe Ib. Le répertoire de ces récepteurs permet la détection de tout changement dans l'expression globale des molécules du CMH à la surface des cellules de l'organisme.

Enfin, un point essentiel pour comprendre le fonctionnement des récepteurs KIR est que si chaque clone de cellules NK peut potentiellement exprimer plusieurs récepteurs inhibiteurs, il n'en possède en règle générale qu'un seul. Cette distribution clonale des récepteurs KIR est importante puisqu'elle permet à un clone NK donné de percevoir l'absence isolée d'un allèle du CMH (Miller and McCullar, 2001; Uhrberg et al., 1997; Valiante et al., 1997).

Tableau I. Principaux récepteurs exprimés par les cellules NK humaines et murines.
Adapté de (Boysen and Storset, 2009)

Liste non exhaustive des principaux récepteurs exprimés par les cellules NK humaines (*Homo sapiens* (HS)) et murines (*Mus musculus* (MM))

Récepteurs	Espèces	Fonction	Ligands
Immunoglobulin-like			
Famille KIR			
CD158, chaîne longue	HS	Inhibition	HLA
CD158, chaîne courte	HS	Activation	HLA
NCRs			
NKp46 (CD335)	HS, MM	Activation	Inconnu/protéines virales
NKp44 (CD336)	HS	Activation	Inconnu/protéines virales
NKp30 (CD337)	HS	Activation	BAT-3/protéines virales
Famille CD2			
CD2	HS, MM	Adhésion/Activation	CD58 (LFA-3)/CD48
2B4 (CD244)	HS, MM	Activation/Inhibition	CD48
NTB-A	HS	Activation	NTB-A
FcγRIIIA (CD16)	HS, MM	Activation	Région Fc des Ig
N-CAM (CD56)	HS	inconnue	inconnue
ILT/LILR (CD85)	HS	Inhibition/Activation	CMH de classe I / HLA
DNAM-1 (CD226)	HS	Activation	PVR (CD155)/Nectine-2 (CD112)
Lectin-like			
L-selectine (CD62L)	HS, MM	Adhésion	GlyCAM, MadCAM, CD34, autre
CD69	HS, MM	Activation	inconnu
CD94/NKG2A/B (CD94/CD159ab)	HS, MM	Inhibition	HLA-E (HS) / Qalβ (MM)
CD94/NKG2C (CD94/CD159c)	HS, MM	Activation	HLA-E (HS) / Qalβ (MM)
NKR-P1 (CD161)	HS, MM	Inhibition/Activation	LLT-1/type C-lectines
NKG2D (CD314)	HS, MM	Activation	MICA, MICB, ULBP
Ly49	MM	Inhibition/Activation	CMH de classe I ou m157 du MCMV
NKp80	HS	Activation	AICL
Integrines			
β2-integrine/LFA-1	HS, MM	Adhésion	iC3b, ICAMs, fibrinogène
DX5 (CD49b)	MM	Adhésion	Collagène, laminine
Superfamille TNF			
CD27	HS, MM	Activation	CD70
FasL (CD95)	HS, MM	Inducteur d'apoptose	Fas
TRAIL (CD253)	HS, MM	Inducteur d'apoptose	Récepteur TRAIL
PRR (Pattern Recognition Receptor)			
TLRs	HS	Activation	PAMPs
Récepteurs aux cytokines			
IL-2Rα (CD25)	HS, MM	Acitvation	IL-2
IL2/IL15Rβ (CD122)	HS, MM	Activation	IL-2/IL-15
IL-21R	HS, MM	Activation	IL-21
Chaîne γ commune (CD132)	HS, MM	Activation	IL-2/IL-15/IL-21
IL-12R (CD218)	HS, MM	Activation	IL-12
IL-18Rα/β	HS, MM	Activation	IL18
IFNRα/β (IFNAR)	HS, MM	Activation	Interférons de type I (IFN-α/β)
Récepteurs aux chimiokines			
Divers (Ref. Gregoire et al., 2007)			

2- Les récepteurs activateurs

La nomenclature initiale des récepteurs KIR était « *Killer Inhibitory Receptors* ». La découverte progressive de molécules homologues ayant une fonction activatrice a conduit à conserver l'acronyme KIR pour désigner « *Killer Immunoglobulin-like receptors* ». Comme les KIR inhibiteurs, **les KIR activateurs** ont pour ligands les molécules du CMH de classe I. Cela peut paraître paradoxal qu'un même ligand puisse entraîner deux types de signaux opposés et l'induction d'un signal activateur par la reconnaissance d'une molécule du soi peut paraître potentiellement dangereux. Néanmoins, lorsqu'une cellule NK co-exprime des KIR activateurs et des KIR inhibiteurs c'est généralement le signal inhibiteur qui l'emporte. De plus, les KIR activateurs reconnaissent les molécules du CMH de classe I avec une plus faible affinité que leurs homologues inhibiteurs. En fait, les KIR activateurs reconnaîtraient principalement des variantes du CMH de classe I que l'on retrouve dans les conditions pathologiques (Rajalingam, 2007). Chez les rongeurs, il a également été montré qu'il existait des molécules Ly49 ayant des propriétés activatrices (Ortaldo and Young, 2005). Les récepteurs NKG2 couplés à la molécule CD94 peuvent également être activateurs ou inhibiteurs : la sollicitation du récepteur NKG2A permet, via la partie intracytoplasmique de la molécule qui contient 2 ITIMs, de transmettre un signal inhibiteur alors que le récepteur homologue, NKG2C, ne possédant pas de séquence ITIM, s'associe à DAP12 porteur d'un ITAM et se comporte comme un récepteur activateur. Comme pour les récepteurs KIR, l'affinité du récepteur inhibiteur pour le ligand est plus importante que celle du récepteur activateur évoquant la possibilité que le récepteur activateur ne soit fonctionnel que si un signal inhibiteur est supprimé.

Plusieurs autres récepteurs activateurs appartenant à la super-famille des immunoglobulines et dont les ligands ne sont pas des produits du CMH, ont été décrits (Bottino et al., 2005; Moretta et al., 2001b). Ils ont été nommés **récepteurs NCR** (pour *Natural Cytotoxicity Receptors*) et regroupent les récepteurs NKp46 (CD335), NKp44 (CD336) et NKp30 (CD337) qui sont très spécifiques des cellules NK. Mis à part quelques exceptions, les récepteurs NKp46 et NKp30 sont exprimés par toutes les cellules NK humaines alors que NKp44 n'est exprimé qu'à la surface des cellules NK activées. Ces récepteurs sont associés à des molécules adaptatrices (CD3 ζ /FcR γ dans le cas du récepteur NKp46, DAP12 dans le cas du récepteur NKp44 et CD3 ζ dans le cas du récepteur NKp30) qui possèdent un ou plusieurs

motifs ITAMs au niveau de leur portion intracellulaire. Les ligands de ces récepteurs ne sont pas connus, mais ils seraient vraisemblablement absents ou inaccessibles aux cellules NK dans les conditions physiologiques. Les ligands des récepteurs NCRs ne seraient exprimés que dans des conditions pathologiques : il a été montré que, les récepteurs NCRs reconnaissent des hémagglutinines virales ainsi que des ligands associés aux tumeurs qui pourraient correspondre à des héparines sulfates (Hecht et al., 2009; Lanier, 2005).

La famille des **récepteurs CD2** regroupe un ensemble de molécules participant au processus d'adhérence inter-cellulaire mais pouvant également avoir des propriétés sur la fonction cellulaire. Les membres de cette famille, les plus étudiés et exprimés par les cellules NK sont 2b4 et CD2. Chez l'Homme et la souris, la molécule 2b4 est exprimée par toutes les cellules NK et peut avoir des propriétés activatrices et inhibitrices, en fonction de son niveau d'expression et de l'affinité pour son ligand (CD48) (Chlewicki et al., 2008; Mathew et al., 2009). La molécule CD2 peut avoir des propriétés activatrices sur les cellules NK mais les cellules NK de souris déficientes en molécules CD2 présentent des propriétés fonctionnelles normales (McNerney and Kumar, 2006).

Le récepteur NKG2D est un récepteur activateur qui, à la différence des autres récepteurs NKG2, ne possède pas de séquence ITIM au niveau de sa portion intracellulaire et n'est pas associé à CD94. Il est exprimé sur la plupart des cellules NK mais aussi des lymphocytes T- $\gamma\delta$ et T CD8⁺, et il est associé à la molécule adaptatrice DAP10. Les ligands de ce récepteur sont connus et, parmi eux, on trouve les protéines de stress MICA et MICB (pour *MHC class I-related chain A and B*) qui sont faiblement exprimées par des cellules épithéliales et fibroblastiques dans les conditions physiologiques. Le stress, les infections virales, les transformations malignes, augmentent fortement leur expression, constituant un signal d'alerte pour les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques. D'autres protéines de stress reconnues par NKG2D (comme ULBP-1, 2, 3 et 4) peuvent apparaître sur la plupart des cellules.

Le récepteur Fc γ RIIIA ou CD16, est impliqué dans la réaction de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC pour *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*) qui correspond à la lyse sélective des cibles recouvertes d'anticorps. Il est également exprimé à la surface des monocytes et des granulocytes, notamment les neutrophiles, sous une forme légèrement différente (Fc γ RIIIB) (Moldovan et al., 1999).

Les récepteurs Toll-like (TLR) ont également été retrouvés à la surface des cellules NK. Chez l'Homme, les cellules NK expriment les ARNm de tous les TLRs connus (TLR 1-10) (Lauzon et al., 2006) mais seulement sept d'entre eux sont exprimés à la surface cellulaire (TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 8 et TLR 9) (O'Connor et al., 2006) (**tableau II**). Chez la souris également, les cellules NK expriment les ARNm de certains TLRs (TLRs 1-4 et TLRs 6-9) (Sawaki et al., 2007). L'activation des cellules NK par les ligands de TLRs peut se faire soit directement (Chalifour et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Sivori et al., 2004) soit indirectement via l'IL-12 sécrétée par les cellules dendritiques (Gorski et al., 2006; Hart et al., 2005). Cependant, certaines données de la littérature peuvent être contradictoires (**tableau II**, (Schmidt et al., 2004; Sivori et al., 2004)).

Tableau II. Les récepteurs Toll Like (TLR) exprimés par les cellules NK humaines

Adapté de (Becker et al., 2003; Chalifour et al., 2004; Hart et al., 2005; Saikh et al., 2003; Schmidt et al., 2004; Sivori et al., 2004)

Récepteurs	Effet sur les cellules NK	Références
TLR 2	Le lipophosphoglycan (LPG) de <i>Leishmania</i> stimule la production d'IFN- γ et de TNF- α de manière directe et en synergie avec des cytokines proinflammatoires	Becker et al., 2003
	Des PAMPs stimulent la production d'IFN- γ et d' α -flagelline de manière directe et en synergie avec des cytokines proinflammatoires.	Chalifour et al., 2004
TLR 3	Des ARN double brins activent la fonction cytotoxique et la production de cytokines (d'IFN- γ et de TNF- α) de manière dépendante de l'IL-12	Sivori et al., 2004
	Des ARN double brins activent la fonction cytotoxique et la production de cytokines (d'IFN- γ et de TNF- α) de manière directe	Schmidt et al., 2004
TLR 4	N'est exprimé que par les cellules NK CD56 ^{dim} après une stimulation virale	Saikh et al., 2003
TLR 5	Des PAMPs stimulent la production d'IFN- γ et d' α -flagelline de manière directe et en synergie avec des cytokines proinflammatoires.	Chalifour et al., 2004
TLR 7	R848 induit la production d'IFN- γ de manière dépendante de l'IL-12	Hart et al., 2005
TLR 8	R848 induit la production d'IFN- γ de manière dépendante de l'IL-12	Hart et al., 2005
TLR 9	Des ADN avec CpG non méthylés activent la fonction cytotoxique et la production de cytokines de manière dépendante de l'IL-12	Sivori et al., 2004

Enfin, les cellules NK expriment plusieurs autres récepteurs et notamment des **molécules d'adhésion**, des **récepteurs aux cytokines (notamment les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15) et aux chimiokines** ; la liste des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK est en constante augmentation.

IV- Ontogenèse et circulation des cellules NK

1- Ontogenèse des cellules NK et maturation

La moelle osseuse est le principal site de développement des cellules NK chez l'adulte (Trinchieri, 1989). Des études plus récentes suggèrent que les ganglions lymphatiques et le thymus peuvent constituer une source alternative (Freud et al., 2005; Vosshenrich et al., 2006). Néanmoins la contribution relative de ces organes au pool de cellules NK contenues dans l'organisme n'est pas connue ; il semblerait qu'elle soit faible, compte tenu du phénotype distinct des cellules issues de ces organes, (Stewart et al., 2007; Vosshenrich et al., 2006). En 2007, Huntington *et al.*, proposent, pour l'homme, un schéma illustrant les différents sites où les cellules NK seraient susceptibles de se développer (**figure 2**) : les précurseurs des cellules NK seraient produits au niveau de la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques et dans le thymus à partir de précurseurs précoces lymphoïdes. Les précurseurs des cellules NK pourraient migrer dans différents tissus de l'organisme tels que les ganglions lymphatiques, le foie et la rate et se développer en cellules NK immatures se différenciant localement en cellules NK matures (Huntington et al., 2007).

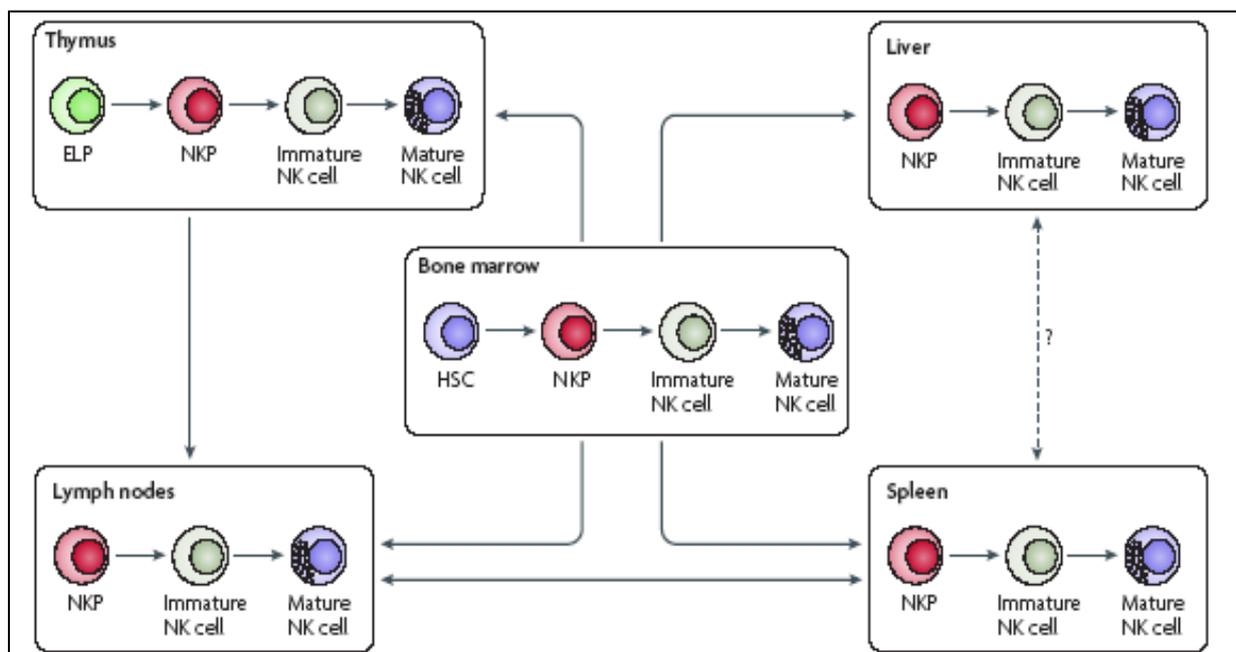


Figure 2. Développement des cellules NK.

Abreviations : ELP, précurseurs lymphoïdes précoces ; NKP, précurseur des cellules NK ; HSC, cellules souches hématopoïétiques (Huntington et al., 2007).

Chez la souris, trois stades de maturation ont été définis, en fonction de l'expression des marqueurs CD11b et CD27 : les cellules CD27^{high} CD11b^{dull} (immatures), les cellules CD27^{high} CD11b^{high} (intermédiaires) et les cellules CD27^{dull} CD11b^{high} (matures). Il a été difficile de mettre en évidence le lieu où se déroule cette maturation car les trois types de cellules NK sont retrouvés dans tous les organes mais il semblerait que les cellules NK immatures produites au niveau de la moelle osseuse acquièrent le phénotype mature en périphérie, en fonction des facteurs environnementaux (Gregoire et al., 2007).

2- Répartition et migration des cellules NK dans les différents compartiments de l'organisme

Les cellules NK sont largement répandues dans l'organisme, aussi bien au niveau des organes lymphoïdes tels que les ganglions lymphatiques, la rate et la moelle osseuse que non-lymphoïdes tels que les poumons, le foie, l'intestin et le sang. Une étude portant sur la répartition des cellules NK chez la souris a montré que c'est au niveau des poumons et du foie que le taux de cellules NK par rapport au taux de lymphocytes T est le plus important. Par contre, en nombre absolu, la rate est l'organe le plus riche en cellules NK (Gregoire et al., 2007). Les cellules NK du sang périphérique peuvent être recrutées au niveau des ganglions lymphatiques et des sites d'inflammation. Ce recrutement est régulé par des chimiokines : chez l'Homme, les cellules NK exprimant la L-sélectine et le récepteur CCR7 sont recrutées au niveau des ganglions lymphatiques. Une fois dans le ganglion, les cellules NK se localisent au niveau de la région correspondant aux lymphocytes T. Chez la souris ce recrutement n'est pas dépendant de l'expression de CCR7 mais de CXCR3 (Kirwan and Burshtyn, 2007). Le recrutement des cellules NK au niveau des sites d'inflammation serait dépendant de l'agent pathogène ayant induit l'inflammation qui, par conséquent attirerait des cellules NK en fonction de l'expression en chimiokines qu'il induit : par exemple, l'importance de l'expression de CCR5 pour le recrutement des cellules NK au niveau des sites infectés par *Toxoplasma gondii* a été démontrée chez des souris déficientes pour le récepteur CCR5 (Khan et al., 2006). La **figure 3** présente quelques exemples de recrutement de cellules NK non activées ou activées au niveau des ganglions lymphatiques et de différents sites d'inflammation en fonction des récepteurs aux chimiokines qu'elles expriment.

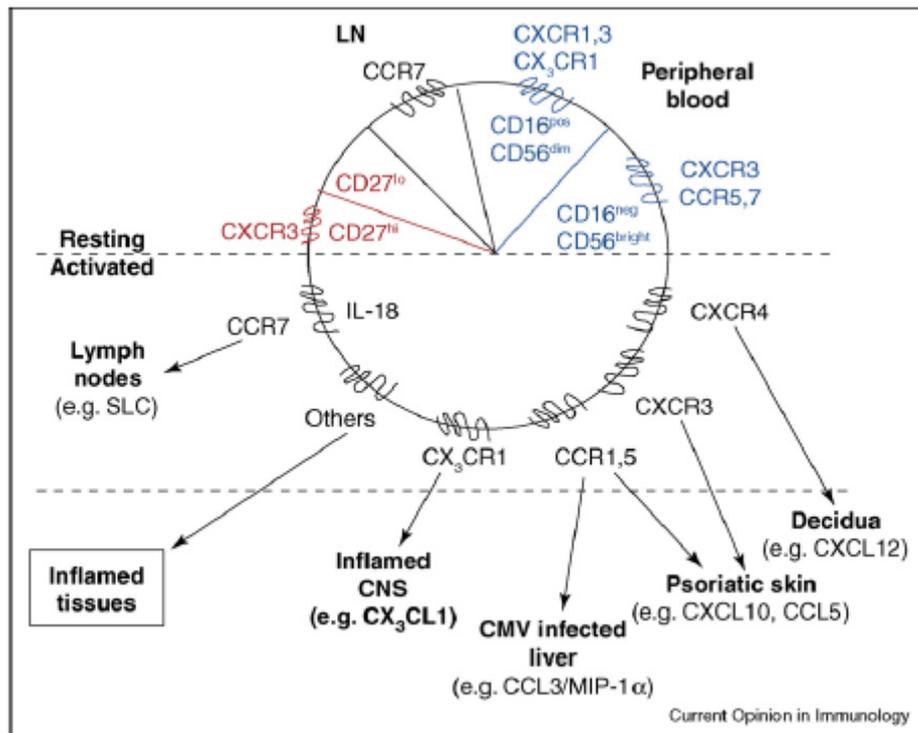


Figure 3. Régulation de la migration des cellules NK par les chimiokines.

Abreviations : LN, ganglion lymphatique ; SLC, chimiokines des organes lymphoïdes secondaires. Les sous ensembles décrits en rouges correspondent à ceux que l'on retrouve chez la souris et ceux en bleu correspondent à ceux que l'on retrouve chez l'Homme. (Kirwan and Burshtyn, 2007)

V- Activité des cellules NK

1- « Éducation » et activation des cellules NK

Pendant longtemps, le dogme était que les cellules NK circulaient dans le sang périphérique dans un état de cellules « prêtes à agir » mais ce concept a récemment évolué puisqu'il a été montré que les cellules NK qui sont dans un état « naïf » répondent spontanément mais faiblement à un élément étranger. Pour que les cellules NK acquièrent une compétence optimale, elles doivent être « éduquées ». Des études réalisées avec des cellules NK issues de souris déficientes en CMH-I ont montré que ces cellules présentaient une activité cytotoxique déficiente suggérant que l'interaction entre leurs récepteurs inhibiteurs et les molécules de CMH de classe I est importante pour l'éducation des cellules NK (Kim et al., 2005; Sola et al., 2009).

D'autre part une stimulation par des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-15, l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-21 serait également nécessaire (Chaix et al., 2008; Lucas et al., 2007). Suite à l'activation par ces cytokines, les cellules NK deviennent des cellules LAK (pour *Lymphokine Activated Killer*) qui prolifèrent, produisent elles-mêmes des cytokines, régulent positivement l'expression des molécules effectrices qui interviennent dans la cytotoxicité (Bottino et al., 2004; Johnsen et al., 1999; Medvedev et al., 1997; Moretta et al., 2004; Trinchieri, 1989). Le **tableau III** présente les caractéristiques des principales cytokines impliquées dans l'activation des cellules NK.

L'IL-2 et l'IL-15 ont un effet sur le développement, l'homéostasie et la fonction des cellules NK. L'IL-2 produite par les lymphocytes T, stimule la prolifération des cellules NK, active leur production de cytokines lorsqu'elle est combinée à d'autres cytokines telles que l'IL-12 et augmente l'activité cytotoxique des cellules NK (Fehniger et al., 2002; Waldmann, 2006). L'IL-15 produite par les monocytes/macrophages activés, présente plusieurs fonctions biologiques similaires à celles de l'IL-2 ; ceci est dû au fait que les récepteurs de ces deux cytokines partagent les mêmes sous unités β et γ_c (IL2/IL15R $\beta\gamma_c$) (Carson et al., 1994). En plus des fonctions similaires à celles de l'IL-2, l'IL-15 a un rôle dans la survie des cellules NK et contrairement à l'IL-2, l'IL-15 est définie comme étant un facteur anti-apoptotique (Becknell and Caligiuri, 2005; Ku et al., 2000; Marks-Konczalik et al., 2000). De plus, contrairement à l'IL-2 qui n'existe que sous forme soluble, *in vivo* l'IL-15 est présente sur la membrane des cellules dendritiques sous forme liée à la sous unité α du récepteur à l'IL-15 (IL-15R α) (Mortier et al., 2008) ; chez la souris cette « trans-présentation » qui se fait lors du dialogue cellules NK / cellules dendritiques apparaît critique pour l'activation des cellules NK (Rubinstein et al., 2006).

Les cellules NK sont également capables de répondre à d'autres cytokines telles que l'IL-12, l'IL-18, les interférons de type I (α et β) sécrétés par les cellules dendritiques et l'IL-21 produite par les lymphocytes T CD4⁺ activés (Brady et al., 2004; Nutt et al., 2004). Toutes ces cytokines stimulent les fonctions effectrices des cellules NK.

Tableau III. Principales cytokines impliquées dans l'activation des cellules NK.

Adapté de (Beadling and Slifka, 2006; Becknell and Caligiuri, 2005; Brunda, 1994; Chaix et al., 2008; Davis et al., 2007; Dinarello, 1999; Goriely et al., 2001; Parrish-Novak et al., 2000; Waldmann, 2006)

Interleukines (IL)	Récepteurs	Cellules productrices	Effet sur les cellules NK	Références
IL-2	Hétérotrimère IL-2R α (CD25) IL-2/15R β γ c (CD132)	Lymphocytes T activés	Prolifération Différenciation	Waldman, 2006 Becknell and Caligiuri, 2005
IL-15	Hétérotrimère IL-15R α IL-2/15R β γ c (CD132)	Cellules dendritiques Monocytes/macrophages	Prolifération Différenciation survie	Waldman, 2006 Becknell and Caligiuri, 2005
IL-12	Hétérodimère IL-12 β 1 IL-12 β 2	Cellules dendritiques Monocytes/macrophages Lymphocytes B	Activation de la production d'IFN- γ et TNF- α Activation de la fonction cytotoxique Prolifération	Brunda, 1994 Beadling and Slifka 2006 Goriely and Goldman, 2007
IL-18	Hétérodimère IL-18R α IL-18R β	Monocytes/macrophages	Induit la production d'IFN- γ Agit en synergie avec d'autres cytokines, notamment l'IL-12	Dinarello, 1999 Chaix et al., 2008
IL-21	Hétérodimère IL-21R α γ c (CD132)	Lymphocytes T CD4 ⁺ activés Lymphocytes NK-T	Prolifération et maturation (agit en synergie avec l'IL-15) Activation de la production d'IFN- γ Activation de l'ADCC	Parrish-Novak et al., 2000 Davis et al., 2007

2- Fonction des cellules NK et mécanismes d'activation

Les cellules T et NK sont issues de la même cellule progénitrice lymphoïde (Colucci et al., 2003), ce qui est probablement à l'origine de leurs fonctions similaires. Les cellules NK ont une **fonction de cytotoxicité** similaire à celle des cellules T CD8⁺ et elles sont également capables de **produire des cytokines** comme les cellules T CD4⁺. Cependant, les mécanismes d'activation des cellules NK ne passent pas par la stimulation d'un seul récepteur activateur spécifique de l'antigène, codé par des gènes qui subissent un réarrangement comme c'est le cas pour les cellules T. Dans le cas des cellules NK, l'activation dépend d'un éventail assez large de récepteurs activateurs et inhibiteurs codés par des gènes de la lignée germinale et c'est l'équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs qui va déterminer le degré d'activation de la cellule NK.

Par ailleurs, ces deux fonctions, cytotoxicité et sécrétion de cytokines, ne sont souvent pas présentes de manière simultanée dans la même cellule NK (Cooper et al., 2001; Di Santo, 2008). A ces deux fonctions déjà bien connues, se sont ajoutées récemment, deux autres fonctions : au-delà de leur rôle de cellules effectrices, les cellules NK ont également été décrites comme étant des cellules permettant de **réguler la fonction d'autres cellules** du

système immunitaire inné et adaptatif (Vivier et al., 2008). De plus, des études chez la souris ont montré que les cellules NK étaient capables, dans certains cas particuliers, de présenter une caractéristique jusque là propre au système immunitaire adaptatif, à savoir, **une réponse de type mémoire** (Sun et al., 2009).

2-1- La fonction cytotoxique

A l'homéostasie, toutes les cellules de l'organisme expriment des molécules du CMH de classe I et les cellules NK reçoivent en permanence un signal inhibiteur. La théorie du « missing self » est le modèle de base permettant d'expliquer le mécanisme de cytotoxicité des cellules NK (Lanier, 2005). Lorsqu'une cellule NK entre en contact avec une cellule qui n'exprime pas ou exprime anormalement très peu de molécules du soi (CMH de classe I), aucun signal inhibiteur n'est délivré, ce qui peut entraîner l'activation de la cellule NK. L'absence d'expression des molécules du CMH de classe I peut avoir lieu suite à une infection virale qui entraîne la baisse d'expression de ces molécules à la surface de la cellule infectée, ou au niveau de tissus transplantés dont les cellules expriment des molécules d'un CMH de classe I étranger à l'hôte. Cependant, les globules rouges et les tissus neuraux qui n'expriment pas ou très peu de molécules du CMH de classe I échappent à la cytotoxicité des cellules NK, ce qui suggère que l'engagement de récepteurs activateurs est également nécessaire. De fait, il a été suggéré que la présence simultanée de signaux inhibiteurs et activateurs est nécessaire à l'activation de la cellule NK (**figure 4**).

Les récepteurs inhibiteurs sont caractérisés par la présence de motifs ITIMs (pour *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition motifs*) au niveau de leur partie intracytoplasmique. Les récepteurs activateurs vont s'associer à des molécules adaptatrices telles que Fc γ RI γ , CD3 ζ , DAP10 et DAP12 qui expriment au niveau de leur portion intracytoplasmique des motifs ITAMs (pour *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation motifs*) (Lanier, 2005). Pour être activés, la plupart des récepteurs activateurs nécessitent un remodelage du cytosquelette d'actine, ce dernier étant bloqué par les signaux des récepteurs inhibiteurs (Stebbins et al., 2003). Les signaux inhibiteurs sont de ce fait très puissants et permettent même d'inhiber plusieurs signaux activateurs présents simultanément.

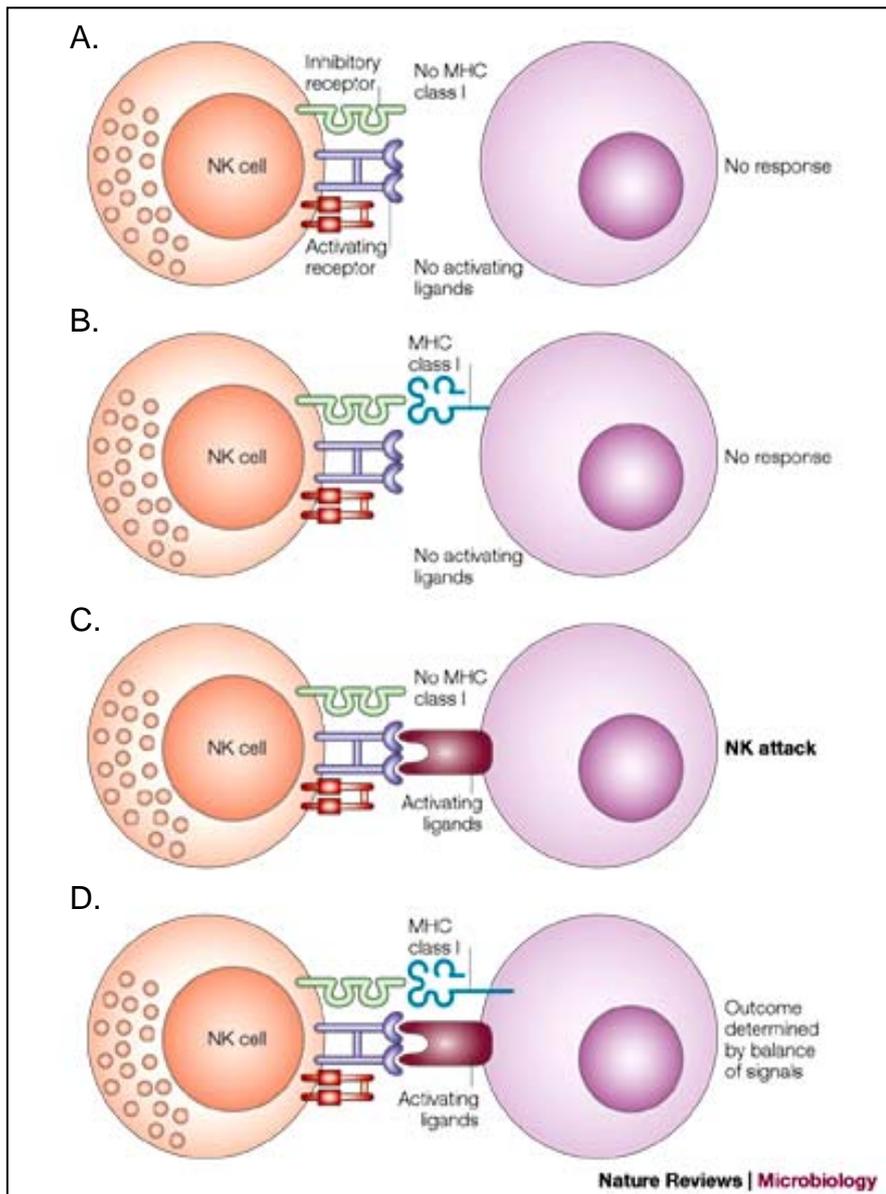


Figure 4. Mécanismes d'activation des cellules NK (Théorie du « Missing self »).

Lorsque les cellules NK rencontrent des cellules qui n'expriment pas de ligands pour leurs récepteurs activateurs aucune réponse n'est initiée (A et B). En revanche, lorsque les cellules NK interagissent avec des cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales qui expriment des ligands pour leurs récepteurs activateurs, la réponse des cellules NK est modulée par les signaux résultant de l'interaction entre leurs récepteurs inhibiteurs et les molécules de CMH de classe I (C et D) : dans le cas d'une infection virale qui entraînerait une diminution d'expression des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules infectées, les cellules NK présenteraient une forte activité cytotoxique due à l'absence d'engagement de leurs récepteurs inhibiteurs (C). Dans le cas d'une infection virale qui n'entraînerait pas de diminution d'expression des molécules de CMH de classe I ou qui au contraire, entraînerait une augmentation de l'expression des molécules de CMH de classe I à la surface des cellules infectées, la réponse des cellules NK dépendrait de la balance entre l'intensité des signaux provenant des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs (D) (Lodoen and Lanier, 2005).

Dans l'organisme, la fonction cytotoxique des cellules NK peut être déclenchée de deux façons différentes : 1- la « cytotoxicité naturelle » qui a lieu en l'absence de stimulation préalable et qui résulte de la balance « positive » entre les signaux activateurs et inhibiteurs ; 2- la cytotoxicité dépendante des anticorps « ADCC » (pour *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*). Les anticorps forment une liaison entre la cellule cible à laquelle ils se lient et, la cellule NK qui fixe le fragment Fc des anticorps via le récepteur CD16 (ou Fc γ RIII). Dans les deux cas, le mécanisme de cytotoxicité est le même que celui décrit pour les lymphocytes T cytotoxiques (page 23) : il se forme une synapse immunologique entre la cellule NK et la cellule cible, au niveau de laquelle la cellule NK libère les molécules de perforine et de granzymes incluses dans les granules, provoquant ainsi la lyse de la cellule cible (Bryceson et al., 2006a). Les cellules NK peuvent également lyser la cellule cible en induisant leur apoptose via les récepteurs Fas ligand (CD178) ou TRAIL (*tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (Huntington et al., 2007) (**figure 5**).

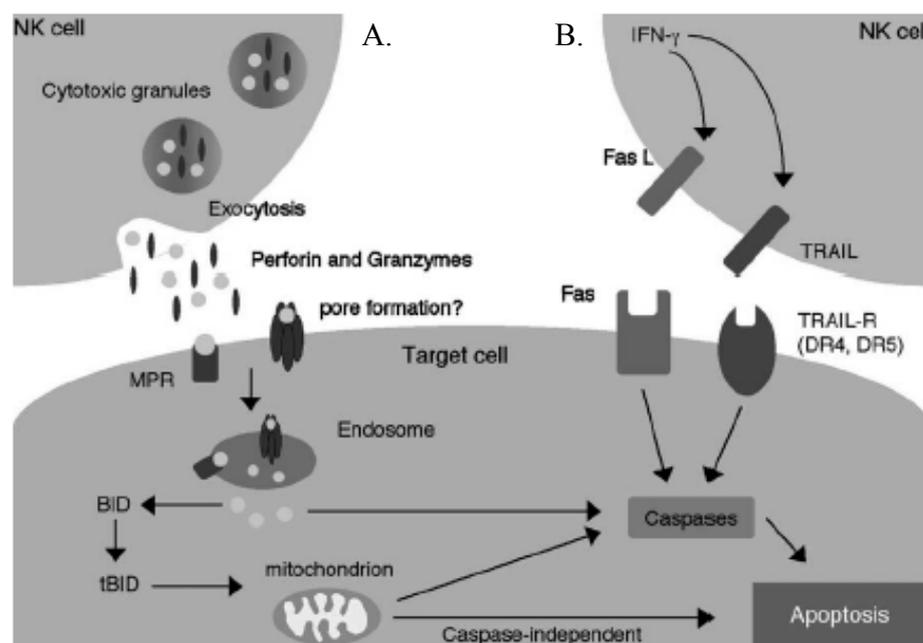


Figure 5. Mécanismes de cytotoxicité des cellules NK.

La cytotoxicité des cellules NK est médiée par deux voies principales : (A), La voie qui passe par l'exocytose des granules, implique la libération des molécules cytotoxiques contenues dans les granules (perforine et granzymes) au niveau de l'espace intercellulaire (synapse immunologique). L'entrée des molécules de granzymes dans la cellule cible peut se faire soit via la perforine qui, en s'insérant au niveau de la membrane plasmique forme des pores, soit via le récepteur mannose-6 phosphate (MPR). Dans la cellule cible les granzymes vont déclencher la mort cellulaire en activant les caspases intracellulaires. (B), L'expression des molécules FasL et TRAIL est régulée par l'IFN- γ . Ces ligands vont se fixer au niveau de leurs récepteurs respectifs, Fas et TRAIL-R (DR4, DR5) présents à la surface de la cellule cible et déclencher l'apoptose dépendante des caspases (Smyth et al., 2005a).

2-2- La production de cytokines

De même que deux types de lymphocytes ont été définis en fonction de la réponse cytokinique induite (Th1 et Th2), chez l'Homme deux types de cellules NK (NK1 et NK2) ont été décrits en fonction du type de cytokines qu'elles sécrètent. *In-vitro*, les cellules NK cultivées en présence d'IL-12 se différencient en cellules NK1 capables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ . Lorsqu'elles sont cultivées en présence d'IL-4, elles se différencient en cellules NK2 sécrétrices de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-13 et l'IL-5 (Peritt et al., 1998). Les cytokines sécrétées par les deux types de cellules NK vont agir sur les cellules de l'immunité adaptative et moduler l'orientation Th1 ou Th2 de la réponse immunitaire adaptative. De manière générale, les cellules NK sont également capables de produire du TNF- α/β et du GM-CSF impliqués dans l'activation des cellules dendritiques et des macrophages ainsi que dans l'orientation Th1 de la réponse immunitaire adaptative. Elles sécrètent également des chimiokines comme Mip-1 α (CCL3) et RANTES (CCL5) impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires (Cooper et al., 2001). Mais contrairement aux lymphocytes T, les cellules NK ne produisent pas d'IL-2.

Dans tous les cas, la production de cytokines par les cellules NK n'est possible que si elles ont été préalablement activées par des cytokines sécrétées par d'autres types cellulaires. Par exemple, les cellules dendritiques, après avoir capturé un agent pathogène, sécrètent de l'IL-12 qui va stimuler les cellules NK de manière synergique avec l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-18 et ainsi favoriser la production de cytokines par les cellules NK (Degli-Esposti and Smyth, 2005; Newman and Riley, 2007).

Récemment un nouveau type de cellule NK présentant la particularité d'exprimer le récepteur NKp44 chez l'Homme et le facteur de transcription RoR γ t chez la souris, a été identifié dans les amygdales et les plaques de Peyer (Cella et al., 2009; Colonna et al., 2009). Ces cellules NK ont la capacité de sécréter de l'IL-22, une cytokine qui appartient à la famille de l'interleukine-10 et qui est impliquée dans la protection de la barrière épithéliale intestinale et d'autres muqueuses contre les agents pathogènes (Aujla and Kolls, 2009; Wolk and Sabat, 2006). En effet, le récepteur à l'IL-22 est exclusivement exprimé à la surface des cellules épithéliales et induit la production de molécules anti-microbiennes (Zheng et al., 2008).

2-3- La fonction régulatrice

La fonction régulatrice des cellules NK est double : d'une part elles peuvent réguler « positivement » certaines cellules c'est à dire contribuer à leur activation et d'autre part, elles peuvent réguler « négativement » la fonction de certaines cellules en les inhibant.

➤ *La régulation « positive »*

Les cellules NK peuvent interagir avec d'autres cellules du système immunitaire telles que les cellules dendritiques et les lymphocytes. La rencontre avec les cellules dendritiques peut se faire aussi bien en périphérie, au niveau du site d'inflammation, que dans les ganglions lymphatiques, et aboutit à une activation mutuelle des deux types cellulaires. L'ensemble des mécanismes impliqués lors de ces interactions est décrit dans les **figures 6 et 7**. Les cellules NK peuvent également moduler la réponse immunitaire adaptative en interagissant directement avec les lymphocytes T au niveau des ganglions lymphatiques (**figure 7**).

➤ *La régulation « négative »*

Dans certaines conditions physiologiques et pathologiques, les cellules NK peuvent avoir une fonction régulatrice négative qui a pour but de maintenir l'homéostasie immunitaire. Un exemple est donné au niveau de la **figure 6** et correspond à la lyse des cellules dendritiques immatures au niveau du site d'inflammation. La raison d'une telle lyse n'a pas été clairement élucidée mais une hypothèse serait qu'elle aurait un rôle dans la limitation de la réponse immunitaire (Ferlazzo et al., 2002). Cette lyse pourrait également contribuer à limiter l'efficacité de la vaccination médiée par les cellules dendritiques (Hayakawa et al., 2004). Les cellules NK peuvent également avoir une fonction régulatrice négative dans les maladies auto-immunes en inhibant les lymphocytes T auto-réactifs (Smeltz et al., 1999).

Face à la découverte de ces fonctions régulatrices des cellules NK, certains auteurs ont spéculé qu'il existerait, comme pour les lymphocytes T, un sous-ensemble de cellules NK régulatrices (NK-reg) mais de nombreuses questions restent à élucider quant au phénotype et au mécanisme d'action de ces cellules (Zhang et al., 2006).

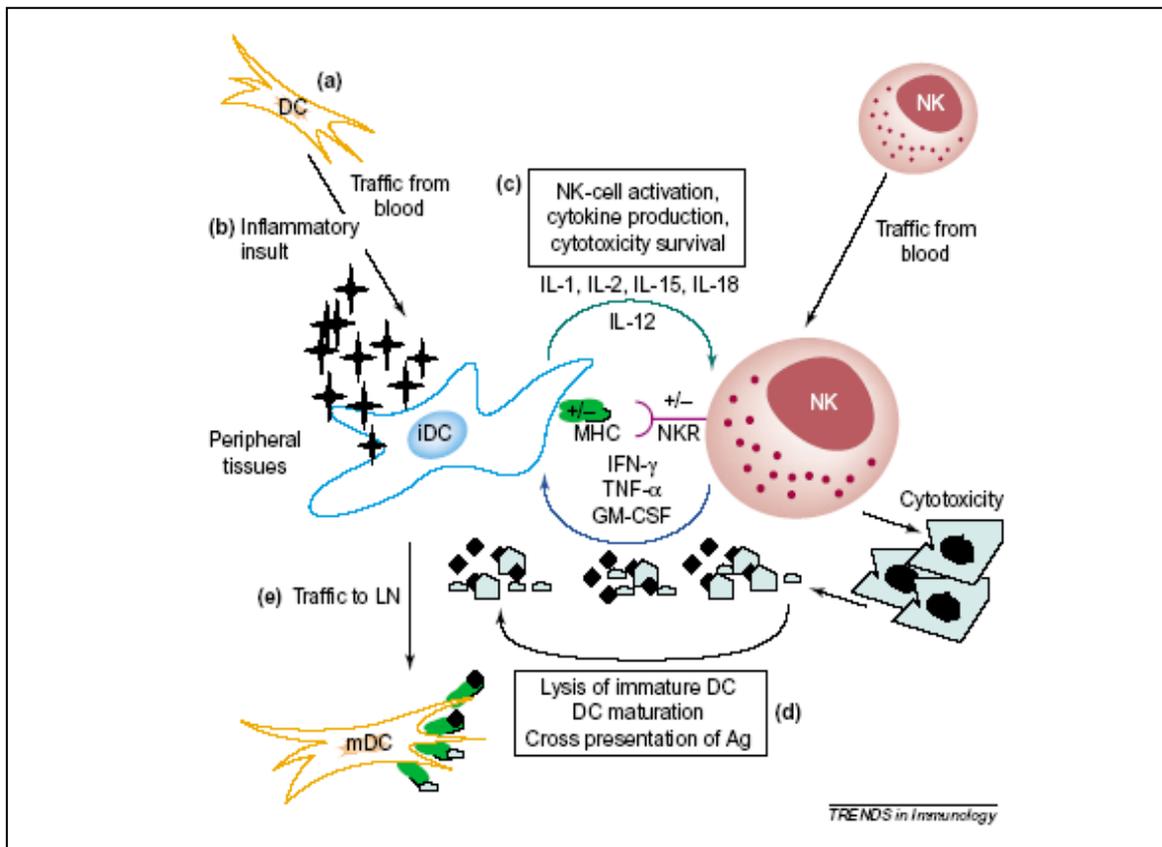


Figure 6. Interaction entre les cellules NK et les cellules dendritiques dans les organes périphériques.

(a), Les cellules dendritiques du sang périphérique sont recrutées au niveau du site d'inflammation en réponse aux signaux inflammatoires. (b), À ce niveau, les cellules dendritiques immatures sont activées suite à la capture de l'agent pathogène. (c), Cette activation se traduit par la sécrétion de cytokines qui vont agir sur les cellules NK recrutées et les activer. (d), Les cellules NK activées, vont en retour synthétiser des cytokines qui vont contribuer à la maturation et l'activation des cellules dendritiques. Elles vont également avoir une activité cytotoxique qui va aboutir à la lyse des cellules infectées dont les antigènes résultants pourront être capturés et cross-présentés par les cellules dendritiques. Enfin les cellules NK peuvent lyser les cellules dendritiques immatures (iDC). (e), les cellules dendritiques matures (mDC) vont migrer vers les ganglions lymphatiques (LN) et déclencher la réponse immunitaire adaptative. (Cooper et al., 2004).

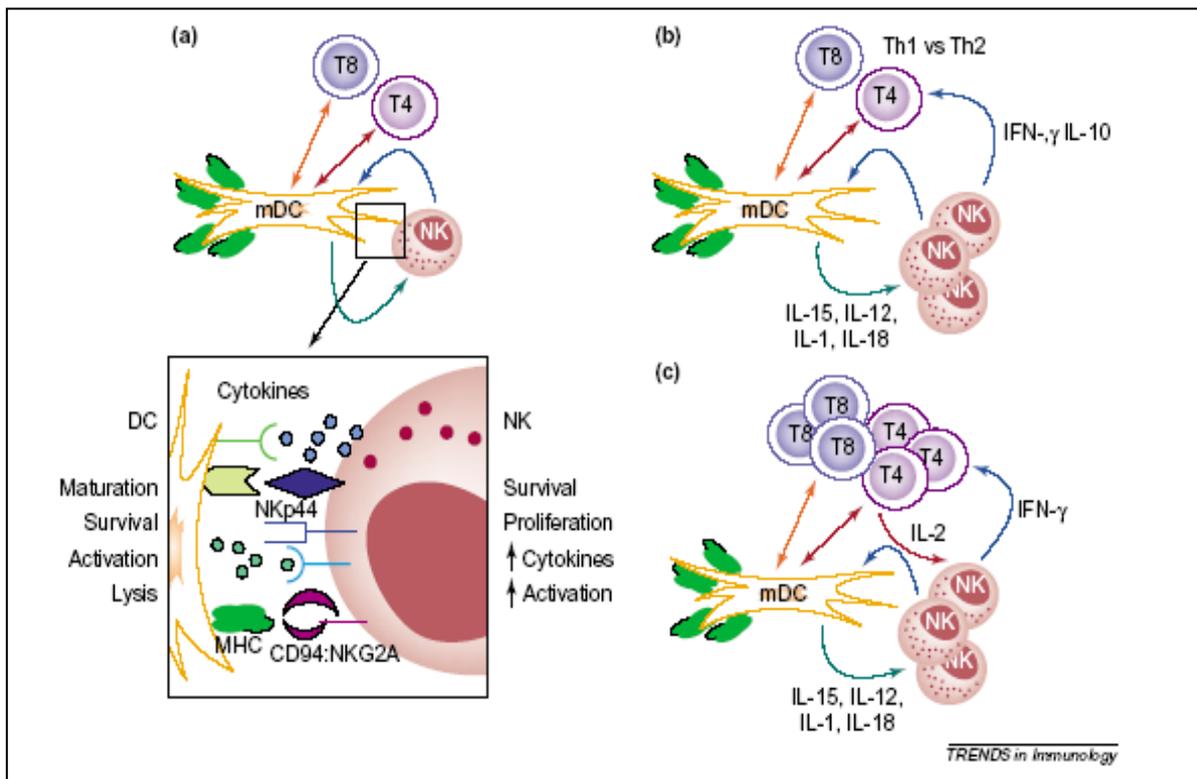


Figure 7. Interaction entre les cellules NK, les lymphocytes T et les cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques

(a), Au niveau du ganglion lymphatique, les cellules dendritiques matures provenant du site d'inflammation vont interagir avec les cellules NK. Cette interaction peut se faire soit via des cytokines, soit via une interaction directe de récepteurs, ce qui aboutit à une activation mutuelle des deux types cellulaires (b), En réponse à l'IL-15, l'IL-12, l'IL-1 et l'IL-18 sécrétées par la cellule dendritique, la cellule NK va s'activer et sécréter de l'IFN- γ ou de l'IL-10 qui vont activer les lymphocytes T et orienter la réponse immunitaire adaptative vers une réponse de type Th1 ou Th2 respectivement. (c), Les lymphocytes T activés prolifèrent et vont produire de l'IL-2 qui va activer les cellules NK. Ces dernières vont en retour produire de l'IFN- γ qui va maintenir l'activation des lymphocytes T. Abreviations : T4, lymphocytes T CD4⁺ ; T8, lymphocytes T CD8⁺. (Cooper et al., 2004).

2-4- La fonction de mémoire

Une des différences majeures entre le système immunitaire inné et adaptatif est la présence d'une mémoire immunologique chez les lymphocytes T et B. La mémoire fait référence à deux caractéristiques : la spécificité antigénique d'une part et une réponse amplifiée suite à une réexposition à l'antigène d'autre part. Les cellules de l'immunité innée ne présentent pas de récepteurs spécifiques pour l'antigène et répondent de la même manière quel que soit le nombre de contacts avec l'antigène. Cependant, dans certains cas les cellules NK sont capables d'avoir des propriétés de mémoire (Ugolini and Vivier, 2009): chez la souris, un sous ensemble de cellules NK qui expriment le récepteur Ly49H qui reconnaît de manière spécifique une protéine du cytomégalo virus murin (MCMV) prolifèrent de manière importante après infection ; le transfert adoptif de ces cellules à des souris sauvages suivi d'une infection par le virus provoque une prolifération encore plus importante des cellules NK et une protection (Sun et al., 2009). D'autres travaux ont montré que les cellules NK sont sensibilisées par une activation cytokinique antérieure et sont capables de répondre de manière plus efficace après une réactivation (Cooper et al., 2009).

VI- Importance des cellules NK dans la réponse immunitaire anti-infectieuse et anti-tumorale

1- Réponse anti-infectieuse

1-1- Cinétique d'intervention des différents acteurs immunitaires lors d'une infection.

Dans le cas des infections virales, la réponse précoce des cellules NK commence à être bien connue. C'est pourquoi nous prendrons l'exemple d'une infection virale pour schématiser la cinétique d'intervention des cellules de l'immunité (**figure 1**). L'état infectieux entraîne la production d'une grande quantité d'interféron de type I (notamment IFN- α) par les cellules infectées et d'IL-12 et TNF- α par les macrophages et les cellules dendritiques activées (courbe rouge). Ces cytokines induisent la prolifération et l'activation des cellules NK (courbe bleue) qui vont de ce fait contrôler la réplication virale et la propagation de l'infection (le titre viral atteint ainsi un plateau pendant 3-4 jours). A la fin de la première semaine d'infection, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques ont proliférés (courbe verte) ainsi que les lymphocytes

B et la sécrétion d'anticorps augmente rapidement (courbe rose); ceci est corrélé avec une diminution rapide du titre viral.

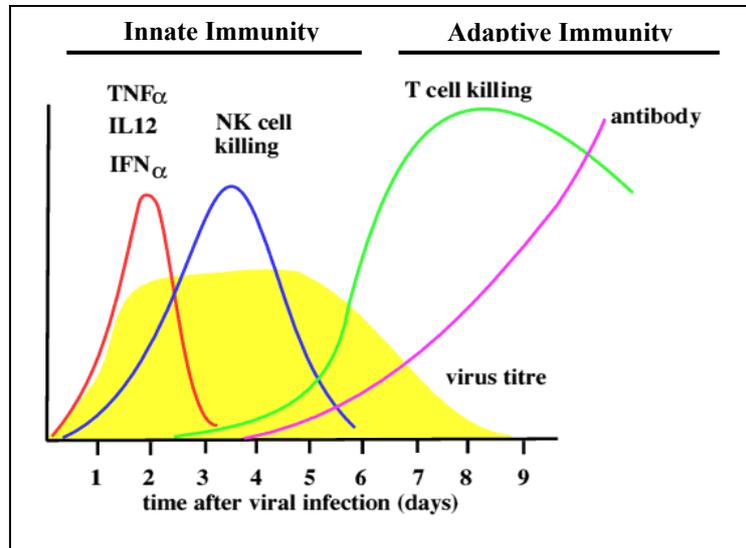


Figure 8. Les cellules NK assurent une réponse précoce lors d'infections virales.

Abréviations : TNF α , Tumor Necrosis Factor-Alpha ; IL12, Interleukine 12 ; IFN α , Interféron Alpha.

Lors d'infections par d'autres agents pathogènes tels que les bactéries et les parasites ou lors d'émergences de tumeurs dans l'organisme, les cellules NK interviennent également, mais les modalités d'intervention des différents effecteurs du système immunitaire ainsi que leur chronologie d'intervention sont moins bien connues.

1-2- Modes d'action des cellules NK

Lors d'une infection virale, parasitaire ou bactérienne, les cellules NK peuvent interagir directement avec la cellule infectée ou indirectement par l'intermédiaire des cellules dendritiques qui sécrètent des cytokines après avoir reconnu l'agent pathogène.

Des études réalisées sur des souris infectées par le cytomégalovirus murin (MCMV) ont clairement montré le rôle des cellules NK dans l'inhibition de la réplication du virus : dans ce cas, l'activation des cellules NK est dépendante de l'IL-12 et des interférons de type 1 (α et β) (Krug et al., 2004). Des études similaires faites chez l'Homme ont montré l'importance de l'IL-12 et des interférons de type I lors de la réponse anti-virale (notamment dans le cas de

l'infection par le virus de l'herpes) des cellules NK (Biron and Brossay, 2001; Biron et al., 1999). De plus, des études portant sur l'implication des cellules NK lors d'une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ont montré que les cellules NK de sujets exposés au virus présentent un phénotype de cellules « activées » ce qui permettrait aux cellules NK d'agir rapidement lors d'une infection par le virus (Ravet et al., 2007). D'autres travaux ont montré que les cellules NK humaines étaient capables d'inhiber la réplication du virus dans des cellules dendritiques infectées par un mécanisme dépendant du récepteur CD85j (Scott-Algara et al., 2008).

Dans le cas d'infections parasitaires par *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* ou *Tetrahymena piriformis*, les cellules NK murines peuvent aussi bien lyser les parasites extracellulaires que les cellules infectées par les parasites (Scharton-Kersten and Sher, 1997) de manière dépendante des IFN- α/β ou de l'IL-12. Dans le cas de l'infection par *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*), il a été montré, chez des souris ne possédant ni lymphocytes, ni cellules NK (souris RAG^{-/-} γ c^{-/-}), que le taux d'excrétion d'oocystes est plus important que celui des souris possédant une quantité normale de cellules NK mais ne possédant pas de lymphocytes (souris RAG^{-/-}), suggérant l'importance des cellules NK dans l'éradication du parasite (Barakat et al., 2009). Chez l'Homme, des cellules NK stimulées avec de l'IL-15, présentent une augmentation de l'expression de NKG2D à leur surface corrélée à la lyse de cellules épithéliales intestinales infectées par le parasite (Dann et al., 2005).

Les cellules NK ont également un rôle lors des infections bactériennes : chez des souris RAG^{-/-}, après infection par *Shigella flexneri*, le titre bactérien est plus faible et la survie des souris plus élevée que ceux des souris RAG^{-/-} γ c^{-/-} (Le-Barillec et al., 2005). Un des mécanismes par lesquels les cellules NK peuvent moduler leur activité pendant une infection bactérienne serait la modification de l'expression de leurs récepteurs de surface. En effet, des cellules NK humaines cultivées en présence de monocytes infectés par *Mycobacterium tuberculosis* présentent une augmentation des récepteurs activateurs NKp30, NKp46 et NKG2D et sont capables de lyser les monocytes infectés via un mécanisme dépendant de NKG2D et NKp46 (Vankayalapati et al., 2005).

2- Réponse anti-tumorale

Les premiers travaux montrant l'importance des cellules NK dans la réponse anti-tumorale ont été faits chez la souris et ont montré que les cellules NK murines ne lysaient que les cellules tumorales n'exprimant pas de molécules de CMH de classe I (Karre et al., 1986). Des études réalisées *in-vivo* chez des souris déficientes en cellules NK ont montré l'importance des cellules NK dans l'élimination des cellules tumorales (Kim et al., 2000). D'autres études ont montré que le contrôle de la croissance tumorale par les cellules NK était dépendant notamment de la perforine, de l'IFN- γ (Street et al., 2001), du TNF- α (Smyth et al., 1998) et des récepteurs NKp46 (Gazit et al., 2004) et NKG2D (Gasser et al., 2005 ; Smyth et al., 2005b).

VII- Particularités des cellules NK utérines

Chez l'Homme, 70% des lymphocytes utérins sont des cellules NK. Les cellules NK utérines sont différentes des cellules NK du sang périphérique. Elles sont caractérisées par le phénotype CD56^{bright}/CD16⁻/CD3⁻. Des études comparant le profil d'expression génique des cellules NK utérines aux cellules NK du sang périphérique ont montré que les cellules NK utérines constituent une sous population unique notamment parce qu'elles surexpriment un nombre significatif de gènes et que plusieurs gènes sont exclusivement exprimés par les cellules NK utérines. La **figure 9** montre un ensemble des molécules qui sont différemment exprimées entre les cellules NK utérines et les cellules NK CD56^{bright} du sang périphérique. Certaines molécules telles que CD9 et CD151 appartenant à la famille des tétraspanines et intervenant dans la stabilisation de complexes membranaires, sont exclusivement exprimées par les cellules NK utérines. D'autres molécules telles que la perforine et les granzymes, sont surexprimées par les cellules NK utérines. Une autre particularité des cellules NK utérines est qu'elles expriment NKp44, un marqueur qui n'est exprimé, à la surface des cellules NK périphériques qu'après activation.

Les mécanismes contrôlant l'accumulation des cellules NK CD56^{bright}/CD16⁻ dans l'utérus sont encore mal connus (Manaster and Mandelboim, 2008). Certaines études suggèrent que les cellules NK CD56^{bright}/CD16⁻ du sang périphérique seraient recrutées dans l'utérus, notamment parcequ'elles expriment des taux élevés de CXCR4 (**figure 9**) qui interagirait

avec la chimiokine CXCL12 produite localement par les cellules du trophoblaste (Keskin et al., 2007). Les cellules NK recrutées, se différencieraient ensuite en cellules NK utérines. D'autres études suggèrent que les cellules NK utérines seraient générées localement à partir de cellules progénitrices (Matsuura-Sawada et al., 2005).

En plus de leur particularité phénotypique, les cellules NK utérines présentent des fonctions distinctes de celles des cellules NK du sang périphérique (Manaster and Mandelboim, 2008; Tabiasco et al., 2006). Bien qu'elles expriment tous les récepteurs NCR (NKp30, NKp44 et NKp46) et davantage de molécules cytotoxiques (en particulier les molécules de perforine et granzymes), les cellules NK utérines sont décrites comme étant moins cytotoxiques que les cellules NK du sang périphérique ; une des explications proposée dans la littérature est que l'activation des cellules NK utérines est contre-balançée par les récepteurs inhibiteurs (en particulier CD94/NKG2A) qu'elles expriment. Les cellules NK utérines se distinguent également par les cytokines et les facteurs de croissance qu'elles produisent. Elles produisent notamment du GM-CSF (pour *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), TNF- α , LIF (pour *Leukemia inhibitory factor*), IFN- γ et CSF-1 (pour *Colony Stimulating Factor 1*). Les cellules NK utérines sont également capables de produire des facteurs angiogéniques de la famille des VEGF (pour *Vascular Endothelial Growth Factor*) et des PLGF (pour *Placental Growth Factor*), impliqués dans le remodelage vasculaire pendant les premiers stades de gestation. Ces données suggèrent que les cellules NK utérines ont un rôle important de cellules régulatrices au niveau de l'interface foeto-maternelle.

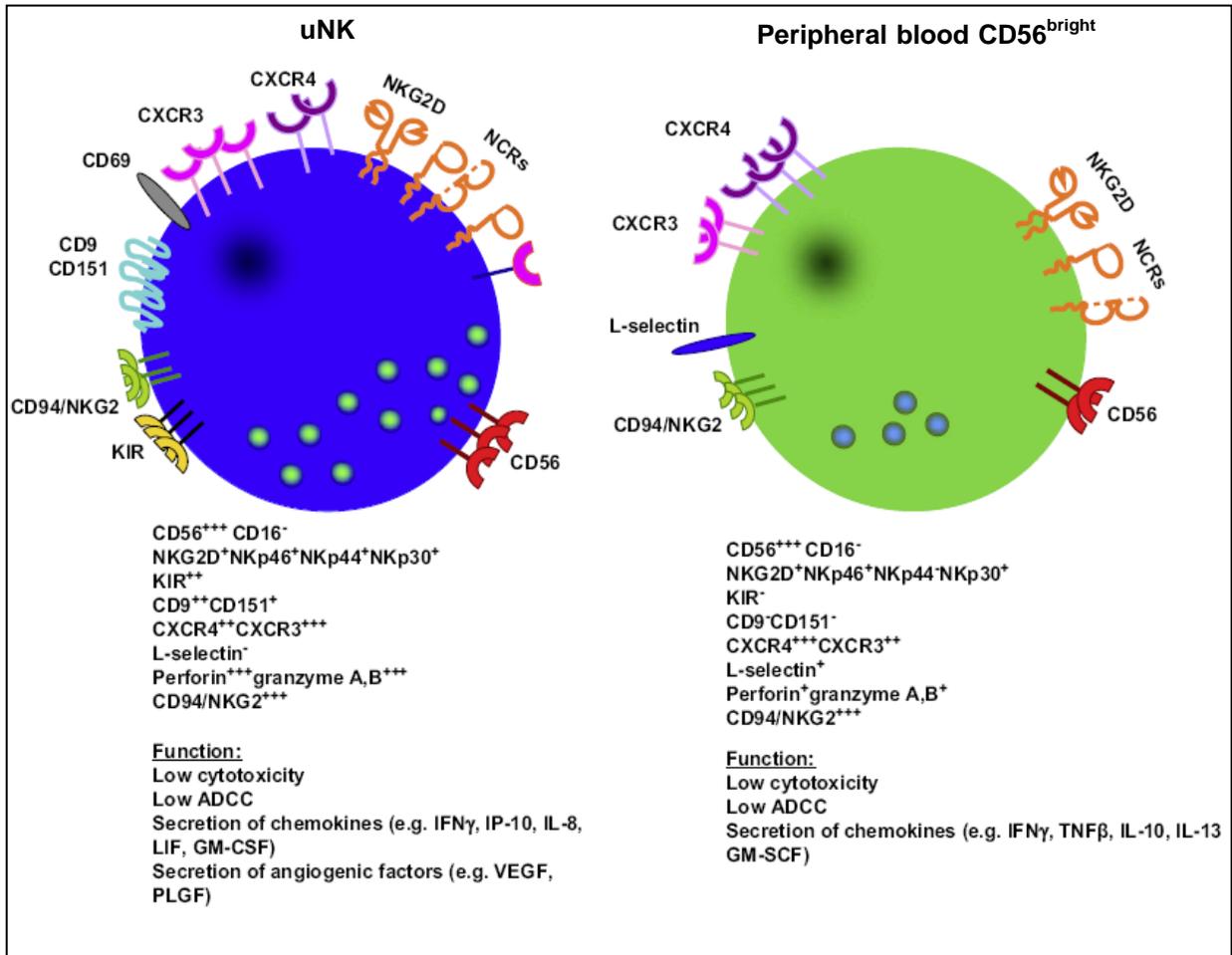


Figure 9. Molécules exprimées par les cellules NK utérines (uNK) et les cellules NK CD56^{bright} du sang périphérique.
(Manaster and Mandelboim, 2008)

VIII- Particularités des cellules NK néonatales

1- Particularités phénotypiques et fonctionnelles

La majeure partie des travaux portant sur les particularités phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK dans la période néonatale ont été faits chez l'Homme, à partir de cellules du sang de cordon ombilical. Le sang de cordon renferme une population de cellules NK phénotypiquement et fonctionnellement hétérogène. En se basant sur les marqueurs CD16 et CD56, quatre sous populations de cellules NK ont été décrites dans le sang de cordon : les cellules CD56^{high}/CD16⁻, CD56^{low}/CD16⁻, CD56⁺/CD16⁺ et CD56⁻/CD16⁺ (Fan et al., 2008). En 1997, Gaddy *et al.*, avaient déjà décrit la population CD56⁻/CD16⁺ (qui n'est pas retrouvée dans le sang périphérique de l'adulte) comme une population de précurseurs potentiels de cellules NK matures (Gaddy and Broxmeyer, 1997). Les cellules NK du sang de cordon semblent exprimer plus de récepteurs activateurs NKG2D, NKp30 et CD69 et moins de récepteurs inhibiteurs LIR-1 que les cellules NK du sang périphérique d'enfants âgés de 2 à 5 ans ou d'adultes. Cependant, la fréquence des cellules NK NKG2A⁺/CD94⁺ (NKG2A/CD94 constitue également un récepteur inhibiteur) est plus élevée dans le sang de cordon que dans le sang périphérique d'enfants ou d'adultes (Sundstrom et al., 2007).

Malgré une plus forte expression de récepteurs activateurs par les cellules NK du sang de cordon, leur activité cytotoxique et leur production d'IFN- γ sont moins fortes que celles des adultes (Fan et al., 2008; Gaddy and Broxmeyer, 1997; Hoshina et al., 1999; Kohl, 1999). L'activité des cellules NK est modulée par l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, produites par les cellules présentatrices d'antigène. En 1998, Lee *et al.*, suggèrent que l'immaturité fonctionnelle des cellules NK du sang de cordon pourrait être partiellement expliquée par une production d'IL-12 par les cellules mononucléées du sang de cordon plus faible que celle des cellules du sang périphérique d'adultes (Lee et al., 1998). En 2005, Satwani *et al.*, montrent, une dérégulation de certains gènes des cellules mononucléées du sang de cordon, codant pour des cytokines immunorégulatrices ce qui pourrait expliquer l'immaturité fonctionnelle des cellules présentatrices d'antigène conduisant à l'immaturité des cellules NK du sang de cordon (Satwani et al., 2005a; Satwani et al., 2005b; Velilla et al., 2006). Cette hypothèse est renforcée par le fait que lorsque les cellules NK de cordon sont stimulées *in-vitro* avec des

cytokines telles que l'IL-12 et/ou l'IL18, elles peuvent atteindre le même niveau de cytotoxicité que les cellules NK d'adulte (Nomura et al., 2001).

L'ensemble de ces observations traduit le fait que les cellules NK néonatales humaines pourraient être « pleinement fonctionnelles », mais que l'environnement dans lequel elles se trouvent *in-vivo*, ne permet pas de les stimuler de manière optimale.

2- Importance des cellules NK dans les défenses anti-infectieuses chez le nouveau-né

Malgré la protection passive dont disposent les nouveau-nés, ils sont plus sensibles aux infections que les adultes. Les premières cellules à entrer en jeu dans la réponse antimicrobienne sont les cellules de l'immunité innée, notamment les cellules NK dont le rôle particulièrement important a été mis en évidence dans certaines pathologies. Les études portant sur l'implication des cellules NK dans les infections néonatales ont surtout été réalisées chez l'Homme. L'exposition de cellules du sang de cordon à *Mycobacterium bovis*, entraîne une réponse immunitaire innée qui se traduit notamment par la production d'IFN- γ par les cellules NK (Watkins et al., 2008). Chez des enfants infectés par le virus respiratoire syncytial, des cellules produisant des granzymes (molécules produites entre autres par les cellules NK) sont présentes dans les lavages broncho-alvéolaires, (Bem et al., 2008). Des expériences *in vitro* utilisant le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ont montré que les cellules NK des nouveau-nés sont capables d'inhiber la réplication du virus de manière plus efficace que les cellules NK des adultes (Bernstein et al., 2004). L'infection congénitale par *Trypanosoma cruzi* induit une diminution du nombre cellules NK dans le sang de cordon, suggérant leur recrutement dans les organes lymphoïdes secondaires (Hermann et al., 2006). Néanmoins, en condition physiologique, l'activité des cellules NK des nouveau-nés est moins forte que celle des cellules NK d'enfants ou d'adultes, ce qui expliquerait en partie l'augmentation de la sensibilité des nouveau-nés aux infections (Gasparoni et al., 2003).

Chapitre III : Les cellules Natural Killer des animaux domestiques

I- Généralités

La grande majorité des études portant sur les cellules NK ont été réalisées chez l'Homme et la souris. Chez les autres espèces animales peu d'études ont été faites faute d'anticorps spécifiques disponibles. En effet, comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre II (page 34), le phénotype des cellules NK était considéré comme étant propre à chaque espèce et par conséquent, des anticorps spécifiques des cellules NK de chaque espèce étaient requis pour les étudier. De ce fait, chez les animaux domestiques tels que le porc, les oiseaux, le chien, le chat, le cheval, le mouton et les bovins, n'ont été décrites que des populations cellulaires ayant des propriétés fonctionnelles ressemblant à celles des cellules NK (Evans and Jaso-Friedmann, 1993). Chez les bovins, depuis que l'anticorps anti-NKp46 a été produit (Storset et al., 2004), des progrès significatifs ont été faits dans la connaissance des cellules NK bovines. Chez les petits ruminants, les rares données concernent des populations non purifiées. Pour le porc et le poulet, une définition plus précise a été récemment proposée via l'obtention d'anticorps spécifiques de ces espèces, au dernier congrès d'immunologie vétérinaire (Bolzer, K. Communication affichée, congrès EVIW, 2009 ; Jansen, C. Communication affichée, congrès EVIW, 2009).

II- Les cellules NK bovines – comparaison avec les cellules NK humaines et murines

1- Les cellules NK bovines sont NKp46⁺/CD3⁻

Lorsque l'anticorps anti-NKp46 bovin a été produit, il a été testé sur plusieurs sous populations de lymphocytes sanguins : la molécule NKp46 était exprimée à la surface d'une population cellulaire minoritaire CD3⁻, ne correspondant ni à des lymphocytes T- $\gamma\delta$, ni à des lymphocytes B, ni aux autres sous-ensembles leucocytaires (Storset et al., 2004) et cette

expression était fortement corrélée avec l'expression du marqueur CD16 (Boysen et al., 2008). Le tri des cellules exprimant le marqueur NKp46 a permis de mieux les caractériser. Elles correspondent à de grandes cellules présentant des granules intra-cytoplasmiques et qui prolifèrent de manière intense lorsqu'elles sont cultivées en présence d'IL-2. De plus ce sont des cellules très cytotoxiques qui sont capables de tuer des cellules cibles murines, humaines et bovines et qui présentent les mêmes caractéristiques que celles des cellules NK des autres espèces (Boysen et al., 2008; Storset et al., 2004). Comme pour les cellules NK des autres espèces, les cellules NKp46⁺ bovines du sang périphérique présentent un faible degré de cytotoxicité sauf dans le cas d'un test de lyse redirigée médiée par NKp46. Les cellules NKp46⁺ bovines produisent de l'IFN- γ en réponse à la stimulation par certaines cytokines telles que l'IL-12 ou par des structures microbiennes (Boysen et al., 2008; Boysen et al., 2006a; Boysen et al., 2006b; Olsen et al., 2005). D'autre part, une forte corrélation au niveau des caractéristiques fonctionnelles et du phénotype a été constatée entre les cellules NKp46⁺ et une population cellulaire obtenue par sélection négative (CD3⁻, CD11b⁻, CD8 α ⁻), et définie comme des cellules NK (Endsley et al., 2006). Ce même groupe, qui a cloné le gène codant pour la granulysine et la NK-lysine bovine (Endsley et al., 2004) a montré que les cellules NK sélectionnées de manière négative expriment les ARNm de la granulysine et du récepteur NKp46 et contiennent de la perforine intra-cellulaire. La perforine intra-cellulaire a également été détectée au niveau des cellules NKp46⁺. L'ensemble de ces données montre que le récepteur NKp46 est un bon marqueur des cellules NK bovines. Cependant, une étude récente a montré l'existence, dans le sang périphérique de bovins, d'une population minoritaire de cellules NK n'exprimant pas NKp46 (Graham et al., 2009).

2- Les récepteurs des cellules NK bovines

Comme pour l'Homme et la souris, la majorité des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK bovines appartiennent à deux catégories de récepteurs : d'une part les récepteurs appartenant à la super-famille des immunoglobulines, codés par des gènes regroupés en cluster LCR (pour *Leucocyte Receptor Complex*) au niveau du chromosome 18 et d'autre part les récepteurs de type C-lectine codés par des gènes regroupés en cluster NKC (pour *Natural Killer gene Complex*) au niveau du chromosome 5 (Storset et al., 2003). Le **tableau IV** présente l'ensemble des récepteurs qui ont été identifiés au niveau des cellules NK bovines. Certains

de ces récepteurs n'ont pas été complètement caractérisés car ils n'ont été identifiés qu'au niveau transcriptionnel.

Tableau IV. Récepteurs identifiés au niveau des cellules NK bovines.

Adapté de (Ahn et al., 2002; Boysen et al., 2008; Boysen et al., 2006b; Boysen and Storset, 2009; Govaerts and Goddeeris, 2001; McQueen et al., 2002; Storset et al., 2004; Storset et al., 2003)

Récepteurs
Immunoglobulin-like
<i>Famille KIR (CD158) *</i>
<i>NKp46 (CD335)</i>
<i>CD2</i>
<i>FcγRIIIA (CD16)</i>
Lectin-like
<i>L-selectine (CD62L)</i>
<i>CD69 *</i>
<i>CD94/NKG2A/B (CD94/CD159ab) *</i>
<i>NKR-P1 (CD161) *</i>
<i>NKG2D (CD314) *</i>
<i>Ly49 *</i>
Integrines
<i>β2-integrine/LFA-1</i>
Récepteurs aux cytokines
<i>IL-2Rα (CD25)</i>
Molécules d'adhésion
<i>CD44</i>

•Identifiés qu'au niveau transcriptionnel ; pas complètement caractérisés

3- Sous populations de cellules NK bovines

L'analyse du phénotype des cellules NK bovines suggère qu'elles représentent une population cellulaire hétérogène. En effet, l'expression de certains marqueurs varie en fonction de l'âge, et du compartiment où elles se trouvent. Notamment, le marqueur CD2 qui correspond à une molécule d'adhésion mais dont le rôle n'a pas été clairement identifié, est exprimé différemment sur les cellules NK du sang périphérique et celles des ganglions lymphatiques : alors qu'une faible proportion de cellules NK du sang périphérique sont CD2⁻, cette sous-population domine au niveau des ganglions lymphatiques (Boysen et al., 2006b). De plus, dans le sang périphérique, le pourcentage de cellules NK exprimant le marqueur CD2 varie en

fonction de l'âge : notamment les veaux âgés de 1 jour présentent une majorité de cellules NK CD2⁻ alors que les animaux dont les cellules NK ont été analysées le jour de la naissance ou sur des animaux plus âgés présentent une majorité de cellules NK CD2⁺ (Graham et al., 2009).

Bien que l'activité cytotoxique des deux sous-populations de cellules NK CD2⁺ et CD2⁻ soit similaire, les cellules NK CD2⁻ semblent être plus activées notamment par le fait qu'elles expriment davantage les marqueurs d'activation CD44 et CD25 à leur surface. De plus, lorsqu'elles sont cultivées en présence d'IL-2, elles prolifèrent mieux et produisent davantage d'IFN- γ que les cellules NK CD2⁺ (Boysen et al., 2006b). Les propriétés fonctionnelles et prolifératives des cellules NK CD2⁻ bovines, ainsi que leur présence en majorité au niveau des ganglions lymphatiques nous laissent penser que cette sous population pourrait être l'équivalent de la sous population CD56^{bright}/CD16⁻ des cellules NK humaines (Fan et al., 2008; Farag and Caligiuri, 2006; Ferlazzo et al., 2004). Elles ont également en commun l'expression du phénotype CD44^{bright} et CD25^{+variable}. Cependant, la grande majorité des cellules NK CD2⁻ bovines expriment le marqueur CD16 et la dualité fonctionnelle correspondant à l'expression du marqueur CD2 sur les cellules NK bovines n'a pas d'équivalent chez l'Homme puisque ce marqueur est exprimé de manière identique à la surface de toutes les cellules NK humaines. De plus, chez les bovins, les cellules NK des ganglions lymphatiques expriment la perforine alors que chez l'Homme, elles en sont dépourvues (Ferlazzo et al., 2004). Enfin, les cellules NK humaines CD56^{dim}/CD16⁺ présentent une cytotoxicité naturelle supérieure à celle des cellules CD56^{bright}/CD16⁻ mais leur activité cytotoxique induite par les lymphokines (LAK pour *Lymphokine-activated Killer*) est identique. Chez les bovins, seule l'activité LAK de cellules NK préalablement cultivées en présence d'IL-2 a été analysée lors de tests de lyse directe ou médiée par des récepteurs activateurs tels que NKp46 ou CD16. Cette activité est identique pour les deux sous ensembles de cellules NK (CD2⁺ et CD2⁻) (Boysen et al., 2006b). Ainsi, malgré quelques similitudes, les principales sous populations de cellules NK décrites chez l'Homme et le bovin ne peuvent pas être directement comparées.

4- Numération des cellules NK bovines dans le sang périphérique.

Chez les bovins, les cellules NK représentent 2 à 10% des lymphocytes du sang périphérique (Endsley et al., 2006; Kampen et al., 2006). Le pourcentage varie en fonction de l'âge des

animaux (Kulberg et al., 2004) et semble être faible pendant la première semaine de vie, puis augmente progressivement avant de rester relativement constant jusqu'à l'âge adulte (Elhmouzi-Younes et al., 2009b). À ces variations s'ajoutent des variations ponctuelles ; en effet, contrairement aux autres populations lymphocytaires, les cellules NK sont les seules cellules dont le pourcentage varie rapidement en fonction du temps. Par exemple, des pourcentages élevés de cellules NK ont été retrouvés chez quelques individus à certaines dates de prélèvement (Kampen et al., 2006). Ceci peut être le résultat d'une mobilisation rapide des cellules NK suite à une infection comme cela a été montré dans le cas l'infection par *Neospora caninum* (Klevar et al., 2007). Chez l'Homme, le pourcentage de cellules NK est globalement plus élevé que chez les bovins avec également une variation en fonction de l'âge (en moyenne 20% dans le sang de cordon et 14% chez l'adulte) (Erkeller-Yuksel et al., 1992; Jentsch-Ullrich et al., 2005). Cette différence entre l'Homme et les bovins, peut être attribuée au fait qu'en contre partie, les bovins présentent un pourcentage relativement élevé de lymphocytes T- $\gamma\delta$ (20% des lymphocytes du sang périphérique des jeunes veaux et 10% chez les adultes) (Kulberg et al., 2004). Chez l'Homme, les lymphocytes T- $\gamma\delta$ représentent environ 5% des lymphocytes du sang périphérique d'enfants et moins de 1% chez l'adulte (Hviid et al., 2000).

5- Répartition des cellules NK dans les tissus

De manière identique à l'Homme et à la souris (Gregoire et al., 2007), en plus de leur présence dans le sang périphérique, des cellules NK ont été détectées et caractérisées au niveau de la rate, des poumons, du foie et des ganglions lymphatiques des bovins (Boysen et al., 2008). Chez les bovins, le nombre de cellules NK dans la rate est comparable à celui du sang périphérique (6-7%) et les organes les plus riches en cellules NK sont le foie et les poumons (jusqu'à 29% des leucocytes). Cette répartition est équivalente à celle décrite chez la souris (Gregoire et al., 2007). Dans les ganglions lymphatiques, le pourcentage de cellules NK est variable : il est plus faible au niveau des ganglions drainant les muqueuses (1-6%) qu'au niveau des autres ganglions (5 -13%) (Boysen et al., 2008). Ces pourcentages sont équivalents ou légèrement plus élevés que ceux qui sont retrouvés dans les ganglions humains (1-7%) (Fehniger et al., 2003; Ferlazzo et al., 2004) et plus élevés que les pourcentages retrouvés dans les ganglions lymphatiques murins (0.3-0.5%) (Bajenoff et al., 2006; Chen et al., 2005). Les cellules NK des ganglions lymphatiques bovins se trouvent au niveau du paracortex et de

la medulla, comme c'est le cas chez l'Homme et la souris (Bajenoff et al., 2006; Fehniger et al., 2003; Walzer et al., 2007a), présentent un phénotype de cellules « activées » ($CD16^+$, $CD25^+$, $CD44^+$) (Boysen et al., 2008) et la particularité d'exprimer le marqueur CD8. Les cellules NK des ganglions lymphatiques bovins, présentes au niveau de la zone paracorticale où se trouvent également les lymphocytes T et les cellules dendritiques peuvent ainsi interagir rapidement avec ces cellules pour moduler la réponse immunitaire. Chez l'Homme, la majorité des cellules NK des ganglions lymphatiques sont $CD56^{\text{bright}}/CD16^-$ et présentent un phénotype de cellules NK « non activées » ($NKp46^{\text{low}}$, perforine⁻). De plus elles n'expriment pas le marqueur CD8. Cependant, après une semaine de culture en présence d'IL-2, les cellules NK issues de ganglions lymphatiques humains deviennent cytotoxiques et présentent le phénotype $NKp46^+/CD16^+/perforine^+$; l'expression du marqueur CD8 n'a pas été analysée (Ferlazzo et al., 2004).

6- Rôle des cellules NK bovines dans la réponse anti-infectieuse

Les études portant sur l'implication des cellules NK lors d'infections ont débuté avant même que l'anticorps anti-NKp46 ait été produit. Des cellules ressemblant aux cellules NK issues de bovins nouveau-nés immunologiquement naïfs réagissaient en proliférant et en produisant de l'IFN- γ lors d'un contact avec des cellules dendritiques infectées par des mycobactéries (Hope et al., 2002). Depuis la production de l'anticorps anti-NKp46 bovin, ces études ont concerné divers agents pathogènes et les mécanismes mis en jeu ont été étudiés plus précisément. En 2005, Olsen *et al.*, ont montré que les cellules NK stimulées par des antigènes mycobactériens ou des protéines purifiées dérivées de *Mycobacterium tuberculosis*, sont capables de produire de l'IFN- γ de manière partiellement dépendante de l'IL-12 (Olsen et al., 2005). Toutefois, la réponse des cellules NK à des agents microbiens tels que *Mycobacterium bovis* ou des mérozoïtes de *Babesia bovis* semble dépendre non seulement de l'IL-12 mais aussi du contact avec les cellules dendritiques (Bastos et al., 2008; Goff et al., 2006). Des études similaires ont été réalisées sur la réponse des cellules NK bovines lors d'une infection par un parasite intracellulaire, *Neospora caninum*. Contrairement aux agents pathogènes précédemment cités, les tachyzoïtes de *Neospora caninum*, vivants ou inactivés par la chaleur, induisent directement la production d'IFN- γ par les cellules NK de manière indépendante de l'IL-12 ; toutefois en présence d'IL-12, la réponse est augmentée. De plus, les cellules NK sont

capables de lyser des fibroblastes autologues infectés par le parasite (Boysen et al., 2006a). *In vivo*, l'infection de bovins par des tachyzoïtes entraîne une augmentation du nombre de cellules NK capables de produire l'IFN- γ dans le sang périphérique (Klevar et al., 2007). L'ensemble de ces travaux montre que la réponse des cellules NK bovines se traduit le plus souvent par une sécrétion d'IFN- γ mais les mécanismes d'activation et l'intensité de la réponse diffèrent en fonction de l'agent pathogène : la réponse peut être directe ou dépendre d'autres cytokines sécrétées par les cellules présentatrices d'antigène, notamment l'IL-12.

III- Les cellules NK des petits ruminants

Très peu d'études ont été faites sur les cellules NK des petits ruminants faute d'anticorps spécifiques disponibles. Néanmoins, quelques publications décrivent la présence de cellules « NK-like » ovines dans le sang et la muqueuse utérine. Les lymphocytes du sang périphérique (PBL pour *peripheral blood lymphocytes*) d'ovins présentent une activité cytotoxique semblable à celle des cellules NK, contre des cellules cibles telles que les cellules humaines K562 (Tuo et al., 1993) et murines YAC-1 (Liu and Hansen, 1993). Les cellules D17 canines infectées par le virus de l'herpes bovin (BHV-1) présentant une diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I à leur surface (Hariharan et al., 1993; Nataraj et al., 1997) ont été utilisées comme cellules cibles des cellules NK-like ovines (Tekin and Hansen, 2002, 2003). Ces travaux ont montré que les PBL ovins ainsi que des préparations de cellules épithéliales endométriales sont capables de lyser les cellules D17 infectées et que cette lyse est réprimée lorsque les cellules sont mises en présence d'inhibiteurs de la perforine et/ou en présence d'anticorps anti-FAM (pour *Function-associated molecule*), molécule exprimée à la surface des cellules NK de plusieurs espèces.

Objectifs

Comme nous l'avons détaillé dans la partie bibliographique, les cellules Natural Killer (NK) sont des acteurs clés du système immunitaire. Elles présentent un double rôle : d'une part, ce sont des cellules effectrices du système immunitaire inné capables d'intervenir précocement lors d'une infection microbienne et d'autre part, elles constituent un lien entre l'immunité innée et adaptative et sont capables de moduler la réponse immunitaire adaptative, en particulier via l'IFN- γ qu'elles sécrètent et qui peut agir sur les cellules dendritiques et les lymphocytes T. Ces cellules ont surtout été étudiées chez l'Homme et les rongeurs.

L'objectif général de ma thèse était d'apporter de nouvelles données sur la biologie des cellules NK des ruminants.

Chez les ruminants, et en particulier chez les bovins, depuis que l'anticorps anti-NKp46, reconnaissant de manière spécifique les cellules NK bovines, a été produit (Storset et al., 2004), les particularités des cellules NK bovines commencent à être mieux connues (Boysen and Storset, 2009). Néanmoins, bien que les nouveau-nés soient tout particulièrement sensibles aux infections, leur système immunitaire est très peu étudié et, dans la littérature, **aucune étude sur les aspects fonctionnels des cellules NK des bovins nouveau-nés n'avait été faite.**

Dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe norvégienne qui a produit l'anticorps anti-NKp46 reconnaissant les cellules NK bovines, **nous avons cherché à mettre en évidence les particularités fonctionnelles des cellules NK des bovins nouveau-nés en les comparant avec les cellules NK de bovins plus âgés. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 1.**

Chez les petits ruminants, caprins et ovins, du fait de l'absence d'anticorps dirigé de manière spécifique contre les cellules NK de ces espèces, **ces cellules n'ont jamais pu être isolées et donc caractérisées en tant que cellules NK clairement identifiées.** Les quelques publications existantes démontrent que les leucocytes sanguins et des cellules isolées de certains tissus, présentent des particularités fonctionnelles ressemblant à celles des cellules NK et en déduisent la présence de cellules « NK-like ».

Nous avons également voulu **combler l'absence d'anticorps dirigé contre les cellules NK des petits ruminants et mis en place une stratégie permettant d'isoler et de caractériser ces cellules.** Dans un premier temps, différents anticorps disponibles pour les cellules NK

humaines, bovines et de rat ont été testés sur les cellules du sang périphérique de caprins et d'ovins. Aucune réaction croisée pertinente n'ayant été observée, la production d'anticorps anti-NKp46 permettant de marquer les cellules NK caprines a été entreprise. A l'issue de ces expérimentations, aucun des anticorps obtenus ne reconnaissait les lymphocytes sanguins des petits ruminants. ***La méthodologie et les résultats sont développés dans la partie correspondant aux travaux non publiés de ma thèse.*** Une stratégie alternative d'isolement des cellules NK par l'utilisation d'une combinaison de plusieurs anticorps a été mise au point. Nous avons comparé les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles de ces cellules ovines avec des cellules NKp46⁺ bovines. ***Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 2.***

Résultats – Articles

I- Particularité des cellules Natural Killer des bovins nouveau-nés

Article 1

Bovine neonate natural killer cells are fully functional and highly responsive to interleukin-15 and to NKp46 receptor stimulation

(Veterinary Research, 2009 Nov-Dec;40(6):54)

Présentation de l'article

Chez les bovins, l'anticorps anti-NKp46 spécifique des cellules NK nous a permis de réaliser une étude sur les cellules NK du sang périphérique de veaux nouveau-nés en comparant leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec les cellules NK de veaux plus âgés.

Nous avons d'une part, mis en évidence les particularités des cellules NK des bovins nouveau-nés et d'autre part, nous avons remarqué l'importance des cytokines utilisées et l'impact qu'elles avaient sur les capacités fonctionnelles des cellules NK en fonction de l'âge de l'animal.

Nous avons montré que les veaux âgés de moins de 8 jours avaient trois fois moins de cellules NK circulantes que les animaux plus âgés. Cependant, *in-vitro*, en présence d'IL-2 ou d'IL-15 (cytokines importantes pour le développement et l'activation des cellules NK) les cellules NK des nouveau-nés proliféraient davantage. Ceci a pu être en partie expliqué par le fait que les cellules NK des nouveau-nés expriment davantage le marqueur CD25, sous-unité α du récepteur à l'IL-2. De plus, dans ces deux conditions de culture, les cellules NK des nouveau-nés étaient plus cytotoxiques lors d'une lyse médiée par le récepteur NKp46. Ceci pourrait être en partie dû au fait que les cellules NK des nouveau-nés expriment davantage le récepteur NKp46 que celles des veaux plus âgés. Lors d'une lyse directe de cellules cibles bovines, les cellules NK des nouveau-nés sont également plus cytotoxiques mais uniquement après avoir été cultivées en présence d'IL-15.

Nous avons analysé la production d'IFN- γ et avons montré que les cellules NK des nouveau-nés et des veaux stimulées avec de l'IL-12 en présence d'IL-2, produisaient des quantités similaires d'IFN- γ mais en présence d'IL-15 elles n'en produisaient pas. Cette dernière caractéristique n'a pour le moment été observée que chez les bovins puisque chez les autres espèces telles que l'Homme et la souris, les cellules NK sont capables de produire de l'IFN- γ dans ces conditions (Carson et al., 1994; Fehniger et al., 2000; Gosselin et al., 1999; Hirose et al., 1999; Warren et al., 1996). Cependant, après activation du récepteur NKp46 et stimulation par l'IL-12 en présence d'IL-15, les cellules NK des nouveau-nés produisaient quatre à cinq fois plus d'IFN- γ que celles des veaux plus âgés.

L'ensemble de ces résultats, nous permet de dire qu'un moment clé dans l'ontogenèse des cellules NK bovines se situe à la fin de la première semaine de vie. De plus, chez le veau nouveau-né, bien que les cellules NK soient présentes en faible quantité, elles sont totalement fonctionnelles notamment dans un environnement IL-15 et lors de la stimulation de leur récepteur NKp46.

Bovine neonate natural killer cells are fully functional and highly responsive to interleukin-15 and to NKp46 receptor stimulation

Jamila ELHMOUZI-YOUNES¹, Anne K. STORSET², Preben BOYSEN²,
 Fabrice LAURENT¹, Françoise DROUET^{1*}

¹ INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique,

Laboratoire Contrôle et Immunologie des Maladies Entériques du Nouveau-né, F-37380 Nouzilly, France

² Department of Food safety and Infection Biology, Norwegian School of Veterinary Science,
 P.O. Box 8146 Dep., N-0033 Oslo, Norway

(Received 28 January 2009; accepted 23 June 2009)

Abstract – Natural killer (NK) cells are key components of the innate immune system with their killing and cytokine producing abilities. Bovine NK cells have been characterized as NKp46⁺/CD3⁻ lymphocytes, but little is known about these cells in neonatal calves. As the newborn calf, with an insufficiently developed acquired immunity, has to employ the innate immune system, we wanted to investigate whether neonate NK cells had the same characteristics as cells from older calves. Freshly isolated neonate and calf NK cells presented the same resting CD2⁺/CD25^{low}/CD8^{-low} phenotype. Neonates less than 8 days old had one third of the circulating NKp46⁺ cells of older calves, but the NK cells proliferated more actively *in vitro* in the presence of interleukin (IL)-2 or IL-15. Moreover, neonate NK cells were more cytotoxic both in an NKp46 mediated redirected lysis assay and in direct killing of a bovine cell line MDBK when cultured in the presence of IL-15. Neonate and calf NK cells cultured in the presence of IL-2 and then stimulated with IL-12 produced similar dose-dependent interferon (IFN)- γ amounts, while IL-15 cultured NK cells did not give such a response whatever the age. However, neonatal NK cells cultured in IL-15 and stimulated by IL-12 concomitantly with cross-linking of NKp46, produced 4 to 5 times more IFN- γ than calf NK cells. These data suggest that although present in lower number at birth, neonate NK cells are fully functional and are more responsive to IL-15 and activation through the NKp46 receptor than NK cells from older calves.

natural killer cell / neonate / bovine / cytotoxicity / interleukin

1. INTRODUCTION

A general feature of neonates is that they have an incompletely developed immune system which leads to an increased susceptibility to infections and a weak response to most vaccines [27, 33, 42, 53, 61]. However, in response to BCG vaccination, neonates can mount a potent T_H1 cell response [34] and acquire

significant protection against the disease. In early life, smaller numbers of immune cells are present in peripheral lymphoid tissues, and qualitative and quantitative differences in cells of the innate and adaptive immune systems have been described [2, 16, 31, 46]. Moreover, at birth, cellular components of the adaptive immune system are in a naive state and several days are required to develop an adaptive response. Therefore, the protection of neonates in the first days of life relies on maternal

* Corresponding author: fdrouet@tours.inra.fr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any noncommercial medium, provided the original work is properly cited.

transmitted immunity through colostrum and their own innate immune system [11, 25, 43]. We have recently demonstrated that mesenteric lymph node or spleen cells from goat neonates stimulated with various toll-like receptor ligands produce much more interleukin (IL)-12 and interferon (IFN)- γ than adult node or spleen cells [58]. This shows that ruminants may have developed some mechanism to compensate for the immaturity of their adaptive immune system during the neonatal period.

Natural killer (NK) cells represent important early effector cells of the innate immune system. These cells can lyse infected and tumour cells without prior sensitisation and are also able to secrete immunomodulatory and antiviral cytokines like IFN- γ , making them important members of the immune system first line of defence. In addition to their role in innate immunity, NK cells can assist T-cells in T_H1 polarization and promote dendritic cell (DC) maturation. Unlike T and B lymphocyte activation which involves re-arranged receptors, NK cell activation is controlled by a limited repertoire of germ line-encoded receptors that do not undergo somatic recombination [40]. To date, in all species, the cell surface phenotype defining NK cells is the absence of CD3 and the expression of the receptor NKp46, a member of the natural cytotoxicity receptor family [6, 17, 22, 54, 56, 63].

In veterinary species, NK cell studies have been delayed because of the lack of antibodies specific for this cell population. Since we generated the first antibody against NKp46 in cattle [56], the majority of studies have been carried out on NK cells from calves about three months old. As in other species, cattle NK cells have been found in blood, liver, lung, spleen and lymph nodes [10] and share characteristics with NK cells from humans, rats and mice. Neonate NK cells have been studied mainly in humans [16, 18, 21, 30, 48, 57]. However, to date, there has been no study on neonatal NK cells from farm animals.

We conducted a comparative study on peripheral blood NK cells from neonates and older calves, to understand better the innate response of newborn calves. Most *in vitro* studies performed with human or rodent NK cells

show that their activation can be modulated by various cytokines [41, 45, 64, 65]. IL-15 and IL-2 are cytokines with overlapping effects on NK cells. They are best known for their effects on development, proliferation, survival and activation of these cells [5]. However, in bovine NK cells, their various effects have not been well documented. IL-12 known to cause NK cells to produce IFN- γ effectively [59], is an appropriate cytokine to demonstrate the difference in IFN- γ producing capability between neonatal and calf NK cells. We therefore analysed the proliferation, cytotoxic activity and IFN- γ production in response to IL-12 of NK cells expanded in the presence of IL-2 or IL-15. Although less numerous, NK cells from neonates are more responsive to stimulating factors, especially IL-15 and NKp46 triggering.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and blood sampling

Clinically healthy female Holstein cattle of various ages reared in conventional but sanitary protected facilities (PFIE, INRA F-37380 Nouzilly; Lycée agricole, F-37230 Fondettes, France) were used in this study. To evaluate the relative numbers of NK cells, blood samples were collected from several animals ranging from 2 days to 3 years old. In the following experiments, we collected blood from 6–7 day-old neonates and 4–10 month-old calves, to standardize the blood sampling conditions.

2.2. Isolation and culture of bovine NK cells

Blood samples were collected on EDTA (BD vacutainers). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were recovered after centrifugation on a density gradient (Histopaque $d = 1.77$; Sigma-Aldrich, Lyon, France). NK cells were isolated from PBMC and cultured as previously described [56]. Briefly, NK cells were positively selected using mAb against NKp46 (AKS1; IgG1) and immunomagnetic anti-mouse pan IgG beads (Dyna, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and cultured in RPMI medium supplemented with 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, non-essential amino acids, 50 μM 2-mercaptoethanol (all GIBCO, Invitrogen), with 10% Fetal Calf Serum (FCS) and 100 U/mL recombinant bovine IL-2

(rbIL-2) or 10 ng/mL recombinant human IL-15 (rhIL-15) (Immuno Tools, Germany). Cytokine doses used to promote NK cell growth are based on previous experiments for IL-2 (100 U/mL) [8] or have been optimized for IL-15 (10 ng/mL). After 24–48 h, beads were spontaneously released from the cells and removed. NK cells were then cultured for the appropriate length of time in medium containing rbIL-2 or rhIL-15.

2.3. Cell labelling and flow cytometry

NK cell surface receptors were single or double labelled on PBMC or cultured NK cells as already described [56] using antibodies against the following molecules: CD2 (MUC2A; IgG2a), CD25 (CACT108A; IgG2a) and TcR1 (GB21A; IgG2b) from VMRD (USA), CD8 (38.65; IgG2a) and NKp46 or NKp46-AF488 (clone AKS1, IgG1) from Serotec (Oxford, UK). Subtype-specific secondary antibodies were conjugated with TC or PE (Caltag Laboratories, Invitrogen). The samples were analysed on a FACS CALIBUR flow cytometer (Becton Dickinson), equipped with cell-Quest Pro software. $2-10 \times 10^4$ viable cells gated in the forward and side scatter plot were analysed. Intracellular perforin labelling was performed with the perforin-FITC kit (clone δ G9, IgG2b) and the Cytotix/Cytopem and Permash solutions from BD Pharmingen. 2×10^5 gated NK cells were analysed.

2.4. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester proliferation analysis

For cell proliferation studies, positively selected NK cells cultured for 20 h in the presence of rbIL-2 or rhIL-15 were incubated with 5 μ M carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) (Molecular Probes, Invitrogen) in PBS with 0.2% bovine serum albumin (BSA) for 10 min at 37 °C; cold RPMI was added and they were then incubated for 5 min on ice. The cells were washed three times in RPMI and cultured in the presence of 100 U/mL rbIL-2 or 10 ng/mL rhIL-15 for 3–6 days. To obtain non-proliferating NK cells as controls, these cells were cultured with rbIL-2 at 1 U/mL [8] and rhIL-15 at 0.1 ng/mL.

2.5. Cytotoxicity assay

The cytotoxic activity of NK cells cultured with rbIL-2 or rhIL-15 was tested against a bovine kidney cell line (MDBK) and a murine tumour cell line

(P815) which expresses Fc γ -receptors, allowing antibody linking for redirected lysis, in a flow cytometry assay adapted from Godoy-Ramirez et al. [28]. Briefly, target cells were labelled with 5 μ M CFDA-SE (Molecular Probes, Invitrogen) in PBS containing 0.2% BSA for 10 min. Then 5 mL cold RPMI was added and the samples incubated on ice for 5 min. They were washed three times in RPMI and immediately used in the cytotoxicity assay. For redirected lysis, the target cells were preincubated with 1 μ g/mL of mAb against NKp46 (AKS1) for 5 min.

NK cells activated with IL-2 or IL-15 for 7–10 days were seeded in a 96-well micro plate with a constant number of target cells (50 000) over a range of effector:target (E:T) ratios (4:1, 2:1, 1:1, 0.5:1, 0.25:1 and 0.125:1). Cells were incubated in a total volume of 200 μ L RPMI supplemented with 10% FCS for 1.5 h in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Cells were then washed with PBS containing 0.2% BSA, and then incubated in the same buffer containing 3 μ M propidium iodide (PI) (Molecular Probes, Invitrogen) for 10 min at room temperature in the dark. Target cells incubated without NK cells and stained with PI served as controls to measure basal apoptosis. Cell samples were kept on ice until flow cytometry analysis. For each E:T ratio, 2×10^4 target cells were acquired. The percentage of specific lysis was calculated as follows: percentage of necrotic target cells when co-cultured with NK cells minus percentage of spontaneous deaths of target cells.

2.6. IFN- γ ELISA

To assess their IFN- γ secretion, NK cells were pre-cultured for 7–10 days in the presence of 100 U/mL of rbIL-2 or 10 ng/mL of rhIL-15. Triplicates of 10^5 cells were then incubated for 20 h in the presence of various rhIL-12 concentrations (Immuno Tools, Germany) (0, 100, 500 and 1 000 pg/mL); rhIL-12 induces the secretion of IFN- γ by bovine NK cells [20].

To assess the effect of cross-linking receptors in IFN- γ production, NK cells were cultured as previously for 20 h in the absence or presence of 100 pg/mL rhIL-12 in 96-wells MaxiSorp plates (NUNC, Germany) pre-coated overnight in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6) with antibodies (anti-NKp46 (AKS1), anti-CD8 (38–65) or anti-CD2 (MUC2A)) to trigger the corresponding receptors. IFN- γ production was measured in the supernatants by ELISA using MaxiSorp plates pre-coated overnight in PBS with anti-IFN- γ mAb (CC330; IgG1, Serotec, Germany), then incubated for 1 h with a blocking buffer containing 0.05% tween, 1% BSA

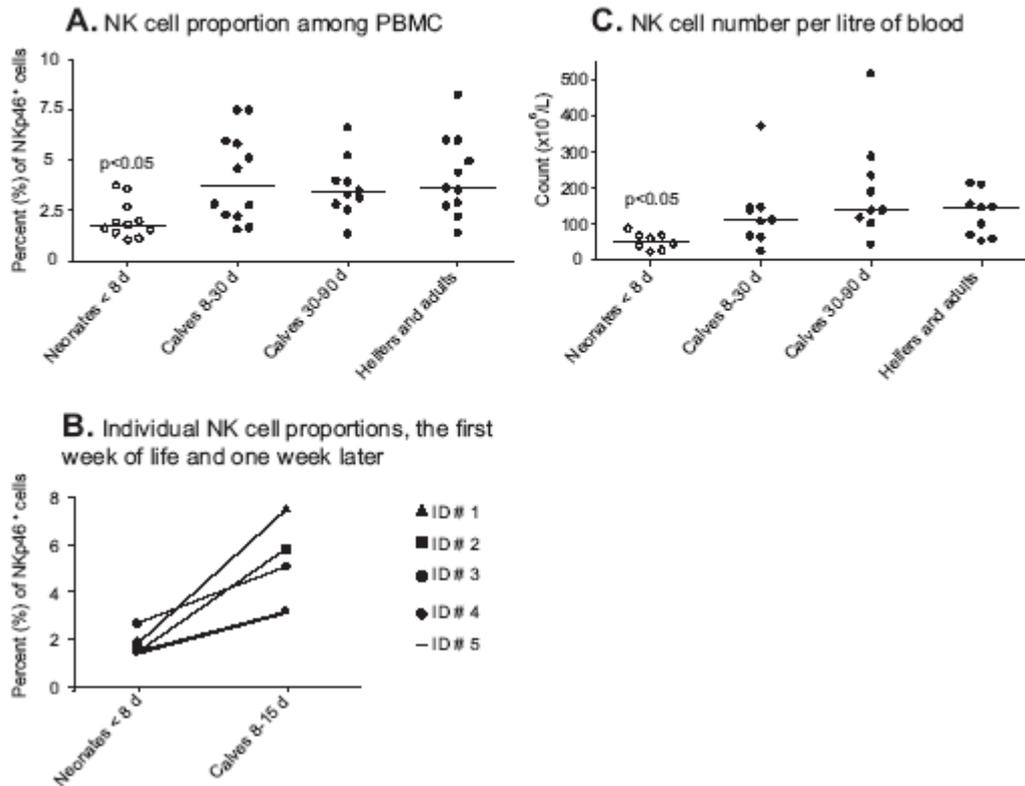


Figure 1. Enumeration of NK cells from birth to adulthood. (A) The proportion of NKp46⁺ cells among PBMC from cattle at different ages was determined by flow cytometry. (B) Total number of NKp46⁺ cells per litre of blood. Individual values and medians are presented. Statistical analysis was carried out with a nonparametric Mann–Whitney test (*p* value is indicated above the scatter plot). (C) The proportion of NKp46⁺ cells among PBMC from five animals (ID # 1 to 5) within the first two weeks of life was determined by flow cytometry.

and 5% sucrose in PBS. To detect IFN- γ capture, a biotinylated anti-IFN- γ mAb (CC302; IgG1, Serotec) was used. Concentrations were calculated from a standard dilution curve of purified bovine IFN- γ (Perbio, Endogen, France).

2.7. Statistical analyses

Nonparametric Mann–Whitney tests and one-way Wilcoxon tests were used to compare data from neonates and calves in various conditions. We calculated the summary measure variable, Area Under Curve, using the trapezium rule as described by Altman [3] as the cytotoxicity assay involved a serial measurement of lysis at different E:T ratios.

3. RESULTS

3.1. Circulating NK cell counts are lower in calves up to a week old than in older cattle

We analysed the number of circulating NK cells in healthy cattle of different ages by labelling PBMC with the NK cell-specific marker NKp46. During the first week of life, the proportion of neonate NK cells among PBMC was less than half that for older calves and adult cattle (Fig. 1A). Moreover, for the same animal the NK cell proportion increased between the

first and the second week of life (Fig. 1B). As neonates have fewer blood PBMC than older calves and adults, they had, on average only a third of the NK cells of older calves and adults per litre of blood (Fig. 1C). Thus, the end of the first week of life appears to be a critical moment in NK cell ontogenesis. We therefore defined animals younger than 8 days as “neonates” and animals between 4 to 6 months old as “calves”.

3.2. Following IL-2 or IL-15 stimulation, CD2⁺, CD8⁺ and CD25⁺ NK cells predominate in cultures from neonates as well as from calves

IL-15 expanded $\gamma\delta$ T-cells can include a population that expresses NKp46 [35]. We double labelled NKp46⁺ cells with anti-NKp46 and anti-TcR1 antibodies and found that NKp46⁺/ $\gamma\delta$ T⁺ cells represented less than 0.01% of PBMC and after 7 days culture, less than 0.3% of the population (Fig. 2A). Resting peripheral blood NK cells do not have the same phenotype as IL-2 expanded NK cells [9, 56]. For both neonate and calf 70–75% of freshly isolated NKp46⁺ cells expressed CD2 but only 10–15% were CD8^{bright} and about 25% expressed CD25 (Figs. 2B and 2C). Thus, the proportions of resting NK cells from neonates and calves expressing CD2, CD8 and CD25 were similar. After 6 days culture in the presence of rbIL-2 or rhIL-15, the percentage of neonate and calf NK cells expressing CD2 was reduced to half, but there was a 3–7 fold increase in the percentage of CD8⁺ NK cells and a 2.5–3 fold increase in that of CD25⁺ NK cells. Therefore, neonate and calf NK cells have similar patterns of expression of CD2, CD8 and CD25 when cultured in the presence of IL-2 or IL-15.

3.3. Neonate NK cells have a higher proliferation capacity when expanded with IL-2 or IL-15 and express more CD25

NK cells were labelled the day after isolation with the cell division marker CFDA-SE, and expanded in the presence of rbIL-2 or rhIL-15, to explore their proliferation capacity. NK

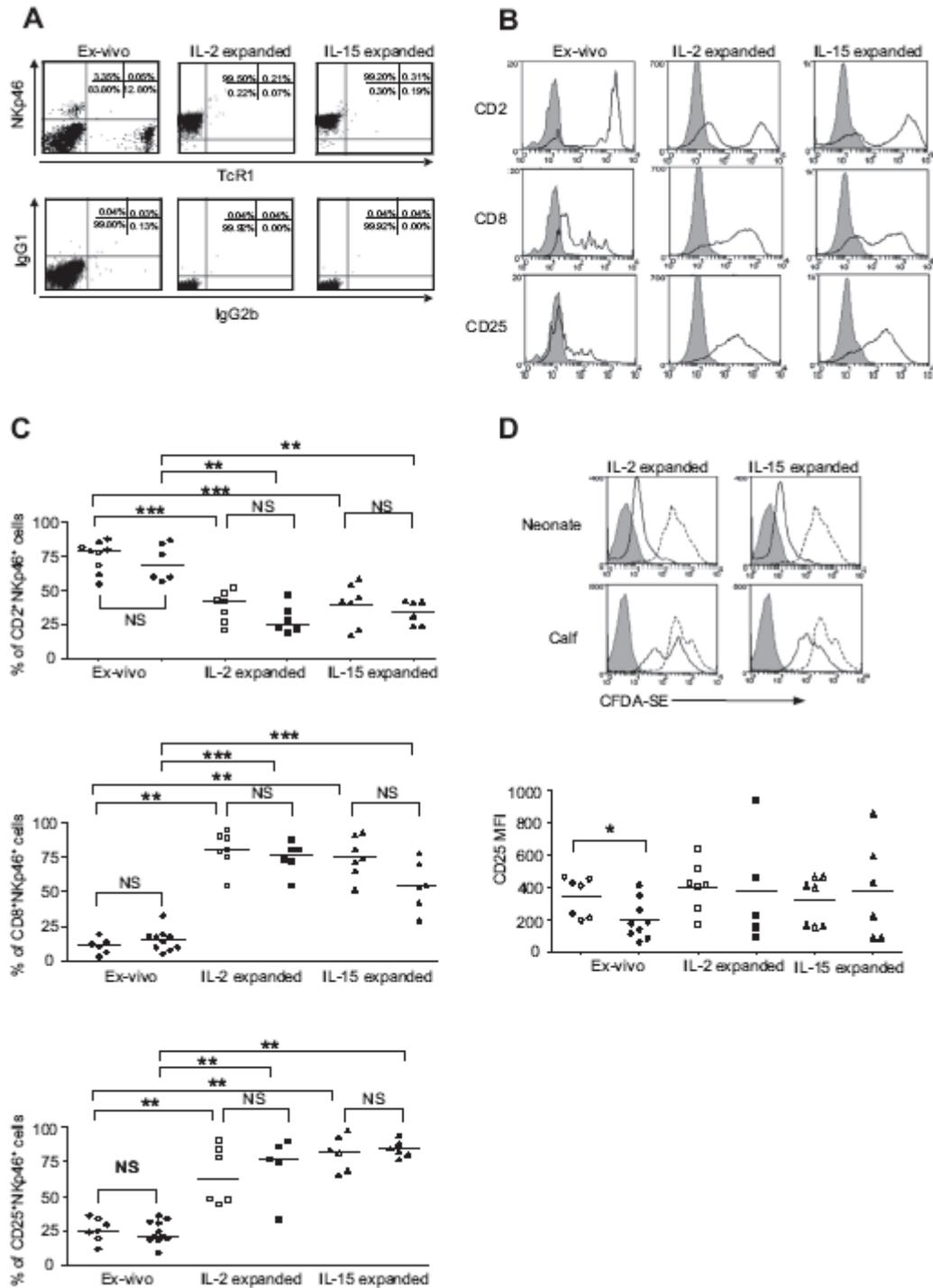
cells cultured with the minimal IL-2 or IL-15 concentrations compatible with cell survival were used as controls. After 3 days of expansion, neonate NK cells had proliferated more rapidly than those from older animals (Fig. 2D). After 6 days culture, the rates of proliferation of neonate and calf NK cells were similar (data not shown), suggesting that NK cells from older calves may need more time to start active proliferation. We analysed the mean fluorescence intensity (MFI) of the IL-2 receptor α -chain (CD25) on resting NK cells to investigate the reasons for the difference in the onset of proliferation. The MFI of CD25 on neonate NKp46⁺ cells in freshly isolated PBMC was slightly but significantly higher than on calf NKp46⁺ cells (Fig. 2D). This difference was still clear after 3 days culture (data not shown), but after 6 days the level of expression of CD25 was similar on neonate and calf NK cells (Fig. 2D).

3.4. NKp46-mediated redirected cytotoxicity is higher in neonate NK cells

We investigated the cytotoxicity of neonate and calf NK cells isolated and expanded for one week in the presence of rbIL-2 or rhIL-15; we performed a redirected lysis assay using anti-NKp46 antibody and P815 murine target cells, which bear an Fc receptor. Neonate NK cells expanded with IL-2 or IL-15 were clearly more cytotoxic than calf NK cells (Fig. 3A). In the presence of an isotype control, no lysis was observed, which indicated the specific involvement of the NKp46 receptor in this test. To investigate whether different expression levels of NKp46 might explain the difference between neonate and calf NK cells, we analysed the fluorescence intensity of this receptor, and found that neonate NK cells had a slight but significantly higher expression of NKp46 than NK cells from calves (Fig. 3B).

3.5. Neonate NK cells show increased direct cytotoxicity when cultured with IL-15

To study NK cell cytotoxicity under more normal physiological conditions, we used a direct lysis assay with the bovine epithelial



kidney cell line MDBK. Under these conditions, neonate and calf NK cells expanded with rbIL-2 had similar cytotoxic activities. However, when expanded with rhIL-15, neonate NK cells killed MDBK target cells more efficiently than NK cells from calves (Fig. 4A). The reason for this difference was investigated by examining the intracellular perforin content of neonate NK cells to see if it was higher than that of calf NK cells, but there was no significant difference (Fig. 4B). Although NKp46 was expressed more on neonate NK cells than on calf NK cells, its expression was similar in IL-2 and IL-15 cultured cells (Fig. 3B); thus, the difference of NKp46 expression is not a likely explanation for the higher cytotoxicity of neonate cells.

3.6. Neonate NK cells can produce larger amounts of IFN- γ than calf NK cells when stimulated with IL-12 and NKp46 in the presence of IL-15

We assessed IFN- γ -production using sorted NK cells from neonates and calves which were expanded in the presence of rbIL-2 or rhIL-15

for 7–10 days and further incubated for 24 h in the absence or presence of different concentrations of rhIL-12. Neonate and calf NK cells produced similar levels of IFN- γ when cultured with rbIL-2 (Fig. 5A, left panel), but when NK cells were expanded in the presence of rhIL-15, the IL12 stimulation did not induce IFN- γ production (Fig. 5A, right panel). However, we previously showed that the engagement of some receptors expressed at the surface of bovine NK cells may influence the level of IFN- γ production [8]. We performed cross-linking assays with the corresponding antibodies, to clarify the involvement of NKp46, CD2 and CD8 receptors in the production of IFN- γ . NK cells were cultured for 24 h in plastic wells pre-coated with NKp46, CD2 or CD8 mAb and IFN- γ levels analysed by ELISA 24 h later. In the absence of IL-12 stimulation, only the triggering of the NKp46 receptor of IL-2-expanded NK cells resulted in a slight but significant increase in the production of IFN- γ in all animals whatever their age. When the cells were stimulated with IL-12, the production of IFN- γ varied according to the cytokine used to expand the cells and the age of the animals:

Figure 2. Phenotype and proliferation of peripheral blood NK cells from neonates and calves. (A) NK cells among PBMC defined as “Ex-vivo” and sorted NKp46⁺ cells cultured for 6 days in the presence of rbIL-2 (“IL-2 expanded”) or rhIL-15 (“IL-15 expanded”) were double labelled with antibodies against NKp46 and TcR1 or with appropriate isotypes. The proportions of cells relative to the total cells in the culture are given. Data shown are from one representative neonate. (B) NK cells among PBMC and sorted NKp46⁺ cells cultured for 6 days in the presence of rbIL-2 or rhIL-15 were double labelled with antibodies against NKp46 and one of the three markers, CD2, CD8 or CD25. Solid lines indicate CD2, CD8 or CD25 expression on NKp46⁺ cells, shaded areas correspond to isotype control mAbs. Data shown are from one animal representative of seven neonates. (C) The percentages of neonate (open symbols) and calf (filled symbols) NKp46⁺ cells expressing CD2, CD8 or CD25 were determined. Individual values and medians are presented. Statistical analyses were carried out with the nonparametric Mann–Whitney test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS: Non significant. (D) NKp46⁺ cells from neonate and calf PBMC were sorted, labelled or not with CFDA-SE the day after isolation and expanded for 3 days with rbIL-2 or rhIL-15. The intensity of CFDA-SE labelling was determined by flow cytometry. The solid black line corresponds to dividing NK cells. The broken line shows NK cells cultured in the presence of rbIL-2 or rhIL-15 concentrations which allow minimal proliferation. The filled grey area shows unlabelled expanded NK cells. Data shown are from one animal representative of four. The MFI of the CD25 marker on neonate (open symbols) and calf (filled symbols) NKp46⁺ cells defined as in (A) and (B) were determined by flow cytometry. Statistical analyses were carried out with the nonparametric Mann–Whitney test. * $p < 0.05$.

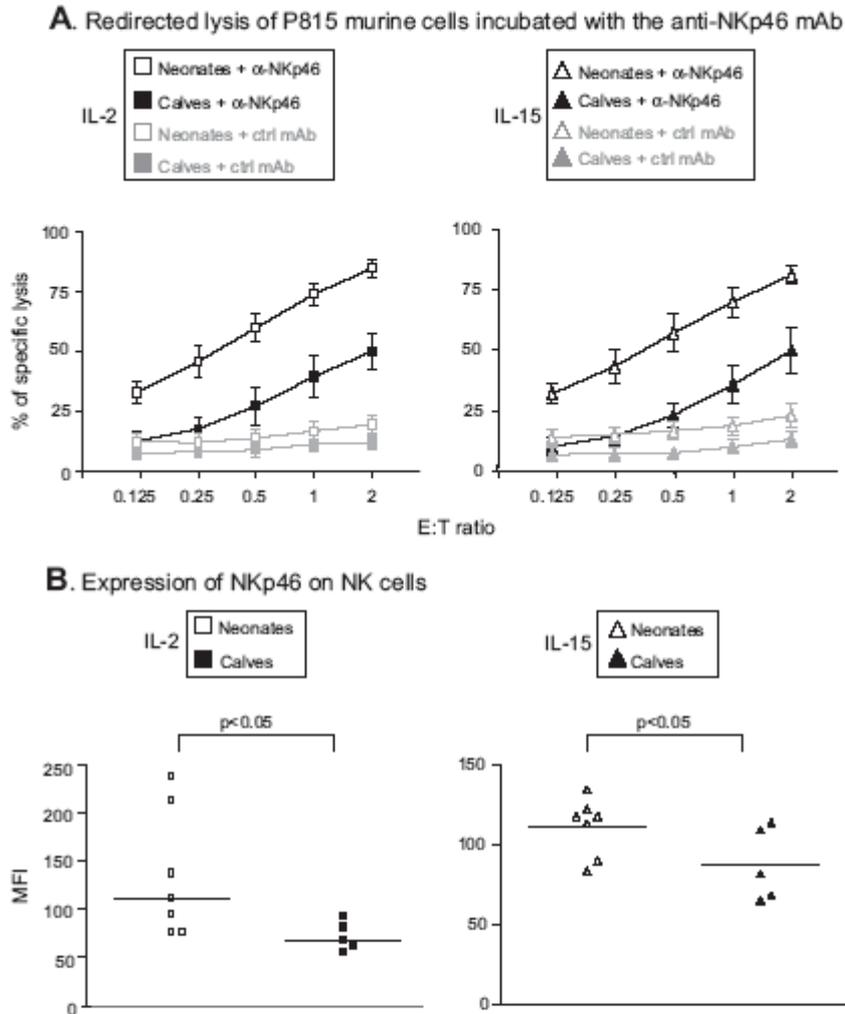


Figure 3. NKp46 receptor mediated cytotoxicity by neonate and calf NK cells. NKp46⁺ cells from peripheral blood of neonates less than 8 days and calves (6 months old) were sorted, cultured in the presence of rhIL-2 or rhIL-15 for 7–10 days and used in a flow cytometry cytotoxicity assay. (A) Redirected lysis of P815 murine target cells carrying an Fc γ receptor by NK cells from neonates (open symbols) or from calves (filled symbols), in the presence of anti-NKp46 mAb (black lines) or with addition of the isotype control (grey lines). Data presented are means from 5 animals \pm SEM. Neonate and calf NK cell cytotoxicity were compared with the one-way Wilcoxon test: $p < 0.01$. (B) Level of expression of the NKp46 receptor after 7–10 days of culture in the presence of rhIL-2 or rhIL-15 (mean fluorescence intensity: MFI). Individual values and medians are presented. The nonparametric Mann–Whitney test (p value is indicated above the scatter plot) was used for statistical analysis.

in IL-2-expanded cultures, the cross-linking of the receptors NKp46, CD2 or CD8 for neonates and NKp46 for calves triggered IFN- γ

production (Fig. 5B, left panel). In IL-15-expanded cultures, the secretion of IFN- γ was lower than with IL-2-expanded cells and an

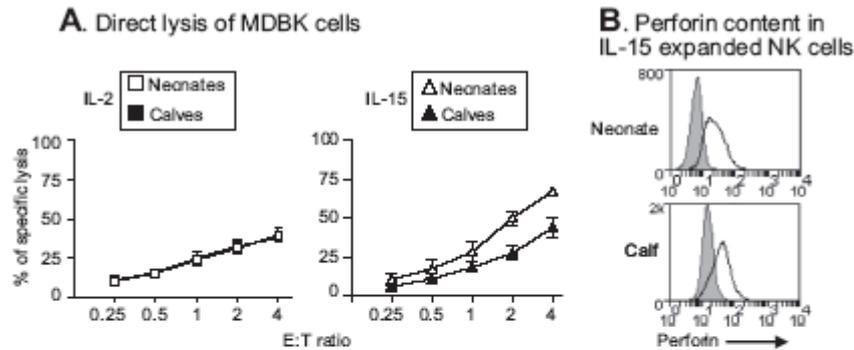


Figure 4. Direct lysis of bovine epithelial cells (line MDBK) by NK cells. NKp46⁺ cells from peripheral blood of neonates less than 8 days old, and calves (6 months old), were sorted and cultured in the presence of rb-IL2 (100 U/mL) or rh-IL15 (10 ng/mL) during 7–10 days and used in a flow cytometry cytotoxicity assay. (A) Direct lysis of MDBK target cells by NK cells from neonates (open symbols) or calves (filled symbols). Data represent means ± SEM (*n* = 3 for cells cultured with IL-2; *n* = 5 for cells cultured with IL-15). Statistical analysis is based on the one-way Wilcoxon test: *p* < 0.05 for IL-15 expanded NK cells. (B) Sorted NKp46⁺ cells cultured for 6 days in the presence of rhIL-15 were labelled with anti-perforin mAb (solid lines) or with isotype control mAb (shaded area). Data shown are from one animal representative of three.

increased IFN- γ production was mostly seen following cross-linking of the NKp46 receptor in NK cells from neonates (Fig. 5B, right panel).

4. DISCUSSION

We conducted a comparative analysis of blood NK cells from healthy neonates and calves, to clarify the peculiarities of neonatal immunity in cattle. We found that PBMC from neonates (less than 8 days old) had less than half the NK cells of older calves, heifers or adults. Moreover, there seemed to be a constant increase of the NK cell numbers during the first week of life, reaching a steady number from the second week. Therefore, in cattle, the end of the first week of life appears to be critical for NK cell ontogenesis. These data complete previous studies of Kulberg et al. (2004) and Kampen et al. (2006) [36, 39] for the neonatal period. There are no studies describing neonate NK cell blood proportions in other veterinary species but, in humans, most studies on cord blood show that there are more NK cells than in adult

peripheral blood [16, 21, 30]. However, some studies on peripheral blood of newborn infants describe a decreased proportion of NK cells compared to adult peripheral blood [18, 48].

We aimed to characterize neonate and calf NK cells, either freshly isolated or expanded in vitro. Resting, circulating neonate and calf NK cells shared a CD2⁺/CD25^{low}/CD8^{-low} phenotype. After in vitro expansion of neonate and calf NK cells, the CD2⁻ subset proliferated and the CD25 receptor was up-regulated as previously described [8, 56]. However, resting neonate NK cells, on a per cell basis, expressed slightly but significantly more of the activating receptor NKp46 (data not shown) and the IL-2 receptor CD25, suggesting that they might be able to respond more rapidly to activating stimuli than calf NK cells. Indeed, during the early stages of culture, NK cells from neonates proliferated more rapidly than those of calves, but both reached the same proliferation rate after 6 days culture. Our data are in line with those of Hope et al. (2002) who described a NK-like cell population in the blood from one-day old calves which proliferated more rapidly than that from older calves [32]. These results suggest

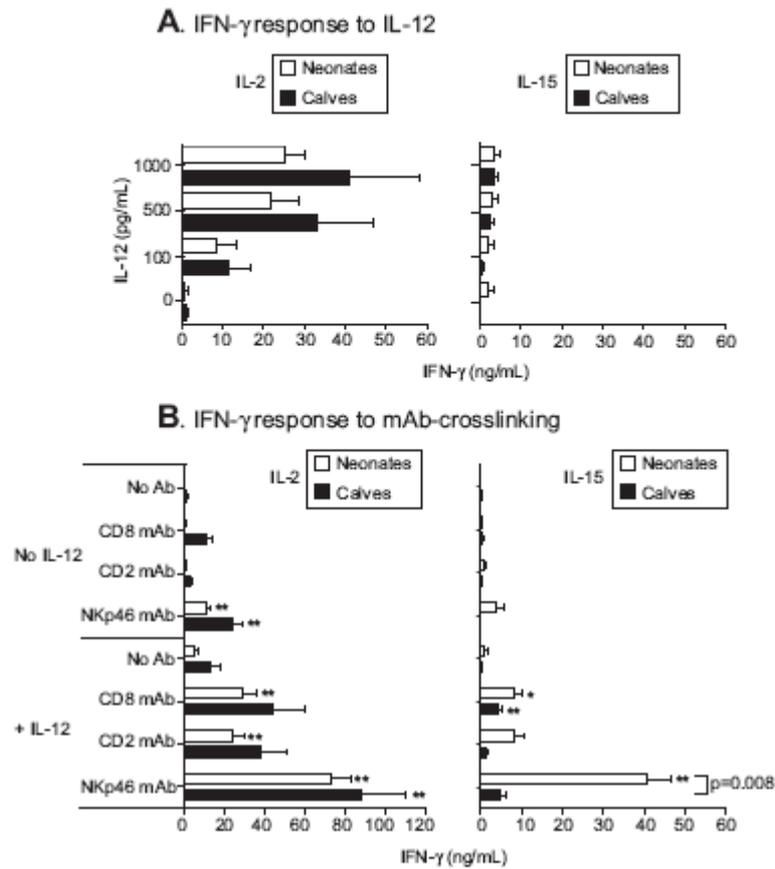


Figure 5. IFN- γ secretion by neonate and calf NK cells. (A) IFN- γ response of NK cells from neonates (open bars) and calves (filled bars) to rhIL-12. Sorted NKp46⁺ cells were cultured in the presence of rhIL-2 or rhIL-15 for 7–10 days. IFN- γ concentrations in the supernatants were analysed by ELISA after stimulation for 20 h with various concentrations of rhIL-12. Data shown are means \pm SEM of four individuals. (B) IFN- γ response induced in NK cells by cross-linking of their NKp46, CD2 or CD8 receptors. RhIL-2 or rhIL-15 activated NK cells were seeded in plastic wells pre-coated with NKp46, CD2 or CD8 mAbs or without antibody, then incubated for 24 h in the presence or not of rhIL-12 (100 pg/mL). The concentration of IFN- γ in the supernatants was analysed by ELISA. Data shown are means \pm SEM of five individuals. Statistical analyses were carried out with the nonparametric Mann–Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ is the comparison between IFN- γ secretion in the presence or absence of antibody cross-linking.

that NK cells from neonates need less time to start active proliferation and this could partly be due to larger numbers of CD25 at their surface [15].

We assayed the cytotoxic properties of NK cells in an NKp46-mediated redirected lysis

and found that neonate NK cells were more cytotoxic than those of calves. Using bovine cells (MDBK line) as targets, we confirmed the higher cytotoxicity of neonate NK cells when expanded with IL-15 but not IL-2. Neonatal NK cells had a slightly higher

NKp46 density than those of calves in both expansion conditions, so this is unlikely to be the main cause of increased cytotoxicity since the IL-2-expanded NK cells killed MDBK equally well. The contribution of other receptors or molecules involved in cytotoxicity should be further investigated, as no difference in intracellular perforin was detected.

In addition to cytotoxicity, another important function of NK cells is to control intracellular pathogens by the production of large amounts of IFN- γ [4, 7, 20, 29, 32, 37, 49, 50]. The dose-dependent IL-12 response of calf and neonate NK cells was strongly emphasized by NKp46 cross-linking and moderately by CD2 or CD8 cross-linking. The results obtained with NKp46 and CD2 are in agreement with our previous studies [7, 8], except that we obtained an IFN- γ secretion even with CD8 cross-linking, possibly because another CD8 antibody was employed here, which apparently bound a reactive epitope. Thus, in addition to the NKp46 receptor, the CD2 and CD8 receptors apparently play a role in mediating effector functions of bovine NK cells, as described in humans [1, 54, 55, 60].

Finally we noted differences in the responses of NK cells depending on the cytokine used to expand them. IL-2 and IL-15 have several similar biological functions because their signalling occurs via shared IL-2/15R β and γ -receptor subunits [12]. However, IL-15 can have other effects; besides its role in NK cell survival, IL-15, unlike IL-2, has anti-apoptotic properties [5, 24, 62] which we also observed. Our IL-15 cultures were more prolific and presented fewer dead cells than IL-2 cultures (data not shown). Neonate and calf NK cells responded differently depending on the cytokine used to expand them. When expanded with IL-15, but not with IL-2, neonate NK cells killed MDBK target cells more efficiently than those from calves did. This is in agreement with human data indicating that IL-15 can act more efficiently than IL-2: (1) on the cytotoxicity of cord blood NK cells in short- and long-term cultures [14, 44, 47], (2) on the restoration of the T lymphocyte cytotoxic function in cancer [13] and (3) for inducing cytotoxicity of intestinal intraepithelial lymphocytes [19]. Regarding IFN- γ

secretion, IL-2 expanded NK cells stimulated with IL-12 were able to produce IFN- γ , while in IL-15 expanded cells the yield was very low for both neonates and calves. In humans, NK cells stimulated with rhIL-12 secreted IFN- γ at similar levels whether expanded with rhIL-2 or rhIL-15 [12, 64]; the difference between these two species might be due to the use of heterologous rhIL-15. However, our data on proliferation and cytotoxicity do not support this hypothesis. Moreover, in IL-12/IL-15 stimulated NK cells, the IFN- γ yield is still very low after the cross-linking of the CD2 or CD8 receptors, while the cross-linking of NKp46 led to a 4–5 fold increase in secretion of IFN- γ by neonate NK cells compared with those of calves. This suggests a crucial role of NKp46 in the activation of neonate NK cells and confirms that they are fully functional. In humans, cord blood NK cells are less functional [23, 26, 33, 38] because mononuclear cells produce less cytokines [41, 51, 52], but when stimulated *in vitro* with IL-12, IL-15 or IL-2, their effector functions are similar to those of adult NK cells [23, 26, 33, 38]. In ruminants, this does not seem to be the case as in goats [58], neonate splenocytes produce much more IL-12 than adult splenocytes when stimulated with TLR ligands. Thus, an adequate *in vivo* cytokine environment produced by monocytes/macrophages might explain the fact that bovine neonate NK cells are already functional; IL-2 produced by T lymphocytes might be present at very low levels during the early stages of the immune response while IL-15 produced by monocytes/macrophages can readily activate NK cells. Therefore, a receptor repertoire modulated by the cytokine environment could partly explain the higher responsiveness of IL-15 expanded neonate NK cells.

In conclusion, although infectious diseases induce high rates of morbidity and mortality in farm animal neonates, their immune system is poorly studied. We present the first comparative study between neonate and calf NK cells. Although less numerous, neonate peripheral blood NK cells proliferate more rapidly, are fully functional and present a higher cytotoxicity and IFN- γ response to IL-15 and NKp46 receptor stimulation.

Acknowledgements. We thank Y. Le Vern from the cytometry laboratory INRA, IASP for his advice on cytometry analysis. We also thank R. Gelineau and D. Serreau (INRA, PFIE) and S. Pioger (Lycée agricole, Fondettes, France) for the blood samples. This work was supported by INRA and Région Centre (fellowship to J. Elh mouzi-Younes) and EGIDE (Aurora project 15824YG).

REFERENCES

[1] Addison E.G., North J., Bakhsh I., Marden C., Haq S., Al-Sarraj S., et al., Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity, *Immunology* (2005) 116:354–361.

[2] Adkins B., Leclerc C., Marshall-Clarke S., Neonatal adaptive immunity comes of age, *Nat. Rev. Immunol.* (2004) 4:553–564.

[3] Altman D.G., Statistics in medical journals: developments in the 1980s, *Stat. Med.* (1991) 10:1897–1913.

[4] Bastos R.G., Johnson W.C., Mwangi W., Brown W.C., Goff W.L., Bovine NK cells acquire cytotoxic activity and produce IFN-gamma after stimulation by *Mycobacterium bovis* BCG- or *Babesia bovis*-exposed splenic dendritic cells, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2008) 124:302–312.

[5] Becknell B., Caligiuri M.A., Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells, *Adv. Immunol.* (2005) 86:209–239.

[6] Biassoni R., Pessino A., Bottino C., Pende D., Moretta L., Moretta A., The murine homologue of the human Nkp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity, *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:1014–1020.

[7] Boysen P., Klevar S., Olsen I., Storset A.K., The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts, *Infect. Immun.* (2006) 74:953–960.

[8] Boysen P., Olsen I., Berg I., Kulberg S., Johansen G.M., Storset A.K., Bovine CD2-/Nkp46⁺ cells are fully functional natural killer cells with a high activation status, *BMC Immunol.* (2006) 7:10.

[9] Boysen P., Gunnes G., Pende D., Valheim M., Storset A.K., Natural killer cells in lymph nodes of healthy calves express CD16 and show both cytotoxic and cytokine-producing properties, *Dev. Comp. Immunol.* (2008) 32:773–783.

[10] Boysen P., Storset A.K., Bovine natural killer cells, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2009) 130:163–177.

[11] Butler J.E., Sinkora M., Wertz N., Holtmeier W., Lemke C.D., Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology, *Vet. Res.* (2006) 37: 417–441.

[12] Carson W.E., Giri J.G., Lindemann M.J., Linett M.L., Ahdieh M., Paxton R., et al., Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor, *J. Exp. Med.* (1994) 180:1395–1403.

[13] Chen Y.M., Ting C.C., Peng J.W., Yang W.K., Yang K.Y., Tsai C.M., Perng R.P., Restoration of cytotoxic T lymphocyte function in malignant pleural effusion: interleukin-15 vs. interleukin-2, *J. Interferon Cytokine Res.* (2000) 20:31–39.

[14] Choi S.S., Chhabra V.S., Nguyen Q.H., Ank B.J., Stiehm E.R., Roberts R.L., Interleukin-15 enhances cytotoxicity, receptor expression, and expansion of neonatal natural killer cells in long-term culture, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (2004) 11: 879–888.

[15] Clausen J., Vergeiner B., Enk M., Petzer A.L., Gastl G., Gunsilius E., Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells, *Immunobiology* (2003) 207:85–93.

[16] Comans-Bitter W.M., de Groot R., van den Beemd R., Neijens H.J., Hop W.C., Groeneveld K., et al., Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations, *J. Pediatr.* (1997) 130:388–393.

[17] De Maria A., Biassoni R., Fogli M., Rizzi M., Cantoni C., Costa P., et al., Identification, molecular cloning and functional characterization of Nkp46 and Nkp30 natural cytotoxicity receptors in *Macaca fascicularis* NK cells, *Eur. J. Immunol.* (2001) 31:3546–3556.

[18] De Vries E., de Bruin-Versteeg S., Comans-Bitter W.M., de Groot R., Hop W.C., Boerma G.J., et al., Neonatal blood lymphocyte subpopulations: a different perspective when using absolute counts, *Biol. Neonate* (2000) 77:230–235.

[19] Ebert E.C., Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes, *Gastroenterology* (1998) 115:1439–1445.

[20] Endsley J.J., Endsley M.A., Estes D.M., Bovine natural killer cells acquire cytotoxic/effector activity following activation with IL-12/15 and reduce *Mycobacterium bovis* BCG in infected macrophages, *J. Leukoc. Biol.* (2006) 79:71–79.

[21] Erkeller-Yuksel F.M., Deneys V., Yuksel B., Hamet I., Hulstaert F., Hamilton C., et al., Age-related

- changes in human blood lymphocyte subpopulations, *J. Pediatr.* (1992) 120:216–222.
- [22] Falco M., Cantoni C., Bottino C., Moretta A., Biassoni R., Identification of the rat homologue of the human NKp46 triggering receptor, *Immunol. Lett.* (1999) 68:411–414.
- [23] Fan Y.Y., Yang B.Y., Wu C.Y., Phenotypic and functional heterogeneity of natural killer cells from umbilical cord blood mononuclear cells, *Immunol. Invest.* (2008) 37:79–96.
- [24] Fehniger T.A., Cooper M.A., Caligiuri M.A., Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer, *Cytokine Growth Factor Rev.* (2002) 13: 169–183.
- [25] Firth M.A., Shewen P.E., Hodgins D.C., Passive and active components of neonatal innate immune defenses, *Anim. Health Res. Rev.* (2005) 6:143–158.
- [26] Gaddy J., Broxmeyer H.E., Cord blood CD16 + 56- cells with low lytic activity are possible precursors of mature natural killer cells, *Cell. Immunol.* (1997) 180:132–142.
- [27] Gerdts V., Mutwiri G.K., Tikoo S.K., Babiuk L.A., Mucosal delivery of vaccines in domestic animals, *Vet. Res.* (2006) 37:487–510.
- [28] Godoy-Ramirez K., Makitalo B., Thorstensson R., Sandstrom E., Biberfeld G., Gaines H., A novel assay for assessment of HIV-specific cytotoxicity by multiparameter flow cytometry, *Cytometry A* (2005) 68:71–80.
- [29] Goff W.L., Storset A.K., Johnson W.C., Brown W.C., Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures, *Parasite Immunol.* (2006) 28:221–228.
- [30] Hannel I., Erkeller-Yuksel F., Lydyard P., Deney V., DeBruyere M., Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations, *Immunol. Today* (1992) 13:215–218.
- [31] Hauser M.A., Koob M.D., Roth J.A., Variation of neutrophil function with age in calves, *Am. J. Vet. Res.* (1986) 47:152–153.
- [32] Hope J.C., Sopp P., Howard C.J., NK-like CD8(+) cells in immunologically naive neonatal calves that respond to dendritic cells infected with *Mycobacterium bovis* BCG, *J. Leukoc. Biol.* (2002) 71:184–194.
- [33] Hoshina T., Kida K., Ito M., Difference in response of NK cell activity in newborns and adult to IL-2, IL-12 and IL-15, *Microbiol. Immunol.* (1999) 43:161–166.
- [34] Howard C.J., Kwong L.S., Villarreal-Ramos B., Sopp P., Hope J.C., Exposure to *Mycobacterium avium* primes the immune system of calves for vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG, *Clin. Exp. Immunol.* (2002) 130:190–195.
- [35] Johnson W.C., Bastos R.G., Davis W.C., Goff W.L., Bovine WC1(-) gammadelta T cells incubated with IL-15 express the natural cytotoxicity receptor CD335 (NKp46) and produce IFN-gamma in response to exogenous IL-12 and IL-18, *Dev. Comp. Immunol.* (2008) 32:1002–1010.
- [36] Kampen A.H., Olsen I., Tollersrud T., Storset A.K., Lund A., Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2006) 113: 53–63.
- [37] Klevar S., Kulberg S., Boysen P., Storset A.K., Moldal T., Bjorkman C., Olsen I., Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves, *Int. J. Parasitol.* (2007) 37:329–339.
- [38] Kohl S., Human neonatal natural killer cell cytotoxicity function, *Pediatr. Infect. Dis. J.* (1999) 18:635–637.
- [39] Kulberg S., Boysen P., Storset A.K., Reference values for relative numbers of natural killer cells in cattle blood, *Dev. Comp. Immunol.* (2004) 28: 941–948.
- [40] Lanier L.L., NK cell recognition, *Annu. Rev. Immunol.* (2005) 23:225–274.
- [41] Lee S.M., Suen Y., Qian J., Knoppel E., Cairo M.S., The regulation and biological activity of interleukin 12, *Leuk. Lymphoma* (1998) 29:427–438.
- [42] Levy O., Zarembek K.A., Roy R.M., Cywes C., Godowski P.J., Wessels M.R., Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848, *J. Immunol.* (2004) 173:4627–4634.
- [43] Levy O., Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates, *Nat. Rev. Immunol.* (2007) 7:379–390.
- [44] Lin S.J., Yang M.H., Chao H.C., Kuo M.L., Huang J.L., Effect of interleukin-15 and Flt3-ligand on natural killer cell expansion and activation: umbilical cord vs. adult peripheral blood mononuclear cells, *Pediatr. Allergy Immunol.* (2000) 11:168–174.
- [45] Marks-Konczalik J., Dubois S., Losi J.M., Sabzevari H., Yamada N., Feigenbaum L., et al., IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited

- in IL-15 transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97:11445–11450.
- [46] Navarro J.A., Seva J., Caro M.R., Sanchez J., Gomez M.A., Bemabe A., Postnatal development of lymphocyte subpopulations in the intestinal mucosa in goat, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1997) 55: 303–311.
- [47] Nguyen Q.H., Roberts R.L., Ank B.J., Lin S.J., Thomas E.K., Stiehm E.R., Interleukin (IL)-15 enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity and natural killer activity in neonatal cells, *Cell. Immunol.* (1998) 185:83–92.
- [48] O’Gorman M.R., Millard D.D., Lowder J.N., Yogev R., Lymphocyte subpopulations in healthy 1–3-day-old infants, *Cytometry* (1998) 34:235–241.
- [49] Olsen I., Boysen P., Kulberg S., Hope J.C., Jungersen G., Storset A.K., Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70, *Infect. Immun.* (2005) 73: 5628–5635.
- [50] Pasquali P., Fayer R., Zarlenga D., Canals A., Marez T., Gomez Munoz M.T., et al., Recombinant bovine interleukin-12 stimulates a gut immune response but does not provide resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal calves, *Vet. Parasitol.* (2006) 135:259–268.
- [51] Satwani P., Ayello J., Ven C., O’Neill A.F., Simpson L.L., Baxi L., Cairo M.S., Immaturity of IL-18 gene expression and protein production in cord blood (CB) versus peripheral blood (PB) mononuclear cells and differential effects in natural killer (NK) cell development and function, *Br. J. Haematol.* (2005) 130:284–292.
- [52] Satwani P., Morris E., van de Ven C., Cairo M.S., Dysregulation of expression of immunoregulatory and cytokine genes and its association with the immaturity in neonatal phagocytic and cellular immunity, *Biol. Neonate* (2005) 88:214–227.
- [53] Siegrist C.A., Neonatal and early life vaccinology, *Vaccine* (2001) 19:3331–3346.
- [54] Sivori S., Vitale M., Morelli L., Sanseverino L., Augugliaro R., Bottino C., et al., p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation, *J. Exp. Med.* (1997) 186:1129–1136.
- [55] Sivori S., Pende D., Bottino C., Marcenaro E., Pessino A., Biassoni R., et al., 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.* (1999) 29:1656–1666.
- [56] Storset A.K., Kulberg S., Berg I., Boysen P., Hope J.C., Dissen E., NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics, *Eur. J. Immunol.* (2004) 34:669–676.
- [57] Sundstrom Y., Nilsson C., Lilja G., Karre K., Troye-Blomberg M., Berg L., The expression of human natural killer cell receptors in early life, *Scand. J. Immunol.* (2007) 66:335–344.
- [58] Tourais-Esteves I., Bernardet N., Lacroix-Lamande S., Ferret-Bernard S., Laurent F., Neonatal goats display a stronger TH1-type cytokine response to TLR ligands than adults, *Dev. Comp. Immunol.* (2008) 32:1231–1241.
- [59] Trinchieri G., Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nat. Rev. Immunol.* (2003) 3:133–146.
- [60] Valentin H., Groux H., Gelin C., Chretien I., Bernard A., Modulation of lymphokine release and cytolytic activities by activating peripheral blood lymphocytes via CD2, *J. Immunol.* (1990) 144: 875–882.
- [61] Velilla P.A., Rugeles M.T., Chougnat C.A., Defective antigen-presenting cell function in human neonates, *Clin. Immunol.* (2006) 121:251–259.
- [62] Waldmann T.A., The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design, *Nat. Rev. Immunol.* (2006) 6: 595–601.
- [63] Walzer T., Blery M., Chaix J., Fuseri N., Chasson L., Robbins S.H., et al., Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2007) 104:3384–3389.
- [64] Warren H.S., Kinnear B.F., Kastelein R.L., Lanier L.L., Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells, *J. Immunol.* (1996) 156:3254–3259.
- [65] Zhang C., Zhang J., Niu J., Zhou Z., Tian Z., Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D, *Hum. Immunol.* (2008) 69:490–500.

II- Caractérisation des cellules Natural Killer des petits ruminants

Travaux non publiés

Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules
Natural Killer des petits ruminants

Dans le but de combler le manque d'anticorps spécifiques dirigés contre les cellules NK des petits ruminants, nous avons testé divers anticorps, commerciaux ou non, pour leur réaction croisée avec les cellules de petits ruminants puis nous avons cherché à développer un outil afin de caractériser ces cellules.

➤ Test d'anticorps commerciaux

Nous avons, dans un premier temps identifié la séquence codant pour la protéine NKp46 caprine. Ce travail a été effectué par A.M. Chaussé, ingénieur de l'équipe.

Des primers permettant d'amplifier la partie du gène codant pour la région extracellulaire et transmembranaire de la protéine NKp46 bovine, ont été choisis et utilisés sur des ADN complémentaires caprins. Après PCR et électrophorèse, l'ADN amplifié a été cloné, séquencé et traduit. La séquence protéique ainsi obtenue a été alignée avec la séquence consensus bovine. La **figure 10** montre l'alignement des deux séquences correspondant à la partie extracellulaire de la protéine NKp46 bovine et caprine et nous pouvons constater une identité de 92%. Nous avons testé l'anticorps AKS1 (Storset et al., 2004), disponible, dirigé contre les cellules NK bovines, pour sa réaction croisée avec les cellules du sang périphérique de caprins et avons constaté l'absence de marquage des lymphocytes caprins. La présence de deux acides aminés supplémentaires au niveau de la séquence bovine (**figure 10**, encadré vert) qui ne sont pas retrouvés au niveau de la séquence caprine, pourrait expliquer l'absence de réaction croisée. Ces 2 acides aminés ne sont pas non plus retrouvés chez le porc.

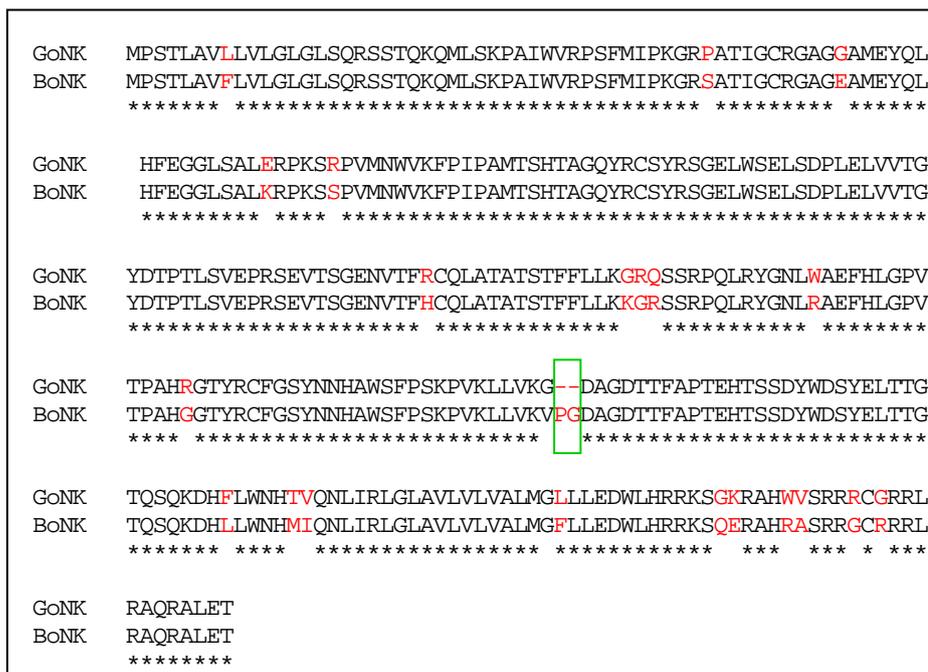


Figure 10. Alignement des séquences protéiques de la partie extracellulaire du récepteur NKp46 caprin et bovin.

Abréviations : GoNK, séquence caprine ; BoNK, séquence bovine. Les acides aminés qui apparaissent en rouge sont ceux qui diffèrent entre les deux séquences.

Nous avons alors testé (en cytométrie en flux) des anticorps disponibles, dirigés contre le récepteur NKp46 de l'Homme et du rat (**tableau V**). Parmi tous ces anticorps, un seul anticorps anti-NKp46 humain (clone N1d9) marquait une population de cellules caprines et ovines qui apparaissait homologue, en taille et en granulosité, aux cellules NK bovines du le sang périphérique. Les cellules reconnues par cet anticorps ont été triées et mises en culture en présence d'IL-2. L'observation des cellules, après quelques jours de culture, a montré qu'il s'agissait d'une population cellulaire hétérogène, ne proliférant pas (ou très peu) et comportant de nombreuses cellules apoptotiques. Nous avons réalisé des doubles marquages avec l'anticorps N1d9 et des anticorps dirigés contre les marqueurs CD4, CD8 et TcR1-N7 ($\gamma\delta$) sur des PBMC caprins et ovins et ceci nous a permis de confirmer l'hétérogénéité de la population marquée avec l'anticorps N1d9. Ces résultats nous ont conduits à ne pas utiliser cet outil et à essayer de produire un anticorps dirigé contre le récepteur NKp46 des cellules NK des petits ruminants.

Tableau V. Anticorps anti-NKp46 humains et anti-NKp46 de rat testés pour leurs réactions croisées avec les PBMC caprins et ovins

Espèce	Clone	Isotype	Source	Réactivité
Souris anti-humain	BAB281	IgG1	Beckman Coulter	-
Souris anti-humain	N1d9	IgG1	Serotec	+
Souris anti-humain	9E2	IgG1	BD Pharmingen	-
Souris anti-rat	WEN21	polyclonaux	E. Dissen*	-
	WEN22			
	WEN23			
	WEN24			
	WEN25			
	WEN26			

*Department of Anatomy, Institute of Basic Medical Sciences, University of Oslo, Norway.

➤ Production d'anticorps monoclonaux

La production d'anticorps monoclonaux (AcM) anti-NKp46 permettant de marquer les cellules de petits ruminants a été réalisée avec la participation d'A.M. Chaussé, ingénieur de l'équipe.

1- Stratégie générale

Avant de procéder à la production d'anticorps monoclonaux nous avons dû au préalable **obtenir la protéine recombinante NKp46 caprine**, d'une part sous sa **forme soluble** pour l'immunisation des souris, d'autre part sous sa **forme membranaire** pour tester la présence d'anticorps dans le sérum des souris et dans les surnageants d'hybridomes. Pour cela, des constructions plasmidiques ont été réalisées par A.M Chaussé :

- Afin de produire la forme soluble, la séquence codant pour la partie extracellulaire de la protéine NKp46 caprine, a été insérée dans un plasmide pFUSE-Fc (Invitrogen). La transfection des cellules avec cette construction plasmidique permet l'obtention d'une protéine recombinante soluble NKp46-Fc.

- Pour produire la forme membranaire, la séquence codant pour la partie extracellulaire et membranaire de la protéine NKp46 caprine, a été insérée dans un plasmide « N terminal p3xFLAG » (Sigma). Cela permet d'obtenir une protéine recombinante NKp46-FLAG membranaire. L'utilisation d'un anticorps anti-FLAG permet d'avoir un contrôle positif lors du criblage des hybridomes.

2- Production de la protéine caprine recombinante soluble NKp46-Fc

La protéine recombinante NKp46-Fc est constituée de deux parties :

- La partie NKp46 qui correspond à l'antigène contre lequel nous voulons générer des anticorps après l'immunisation des souris.
- Le fragment Fc d'immunoglobuline murine permet de purifier la protéine et de révéler (avec un anticorps anti-Fc) sa présence dans les surnageants de culture.

La protéine recombinante caprine NKp46-Fc soluble a été produite par transfection de la lignée cellulaire 293S (**figure 11**). La lignée cellulaire 293S est dérivée de la lignée de cellules rénales embryonnaires humaines HEK293 qui a été adaptée à la culture en suspension (**annexe 2**). La transfection a été réalisée en utilisant un kit commercial, FreeStyle™ Max 293 Expression System (Invitrogen ; #K9000-10).

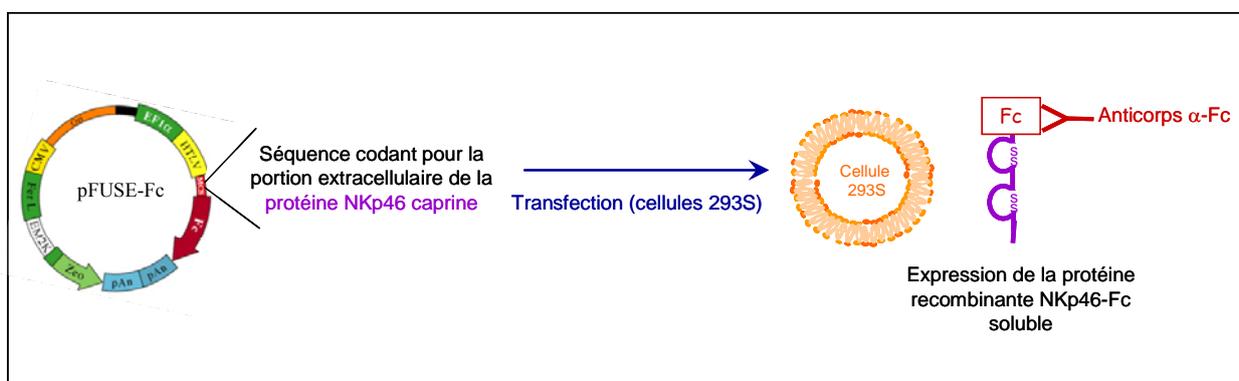


Figure 11. Transfection cellulaire permettant l'expression de la protéine recombinante NKp46-Fc.

2-1- Vérification de la production de la protéine recombinante NKp46-Fc par les cellules transfectées

Nous avons vérifié la production de la protéine recombinante NKp46-Fc dans le surnageant de culture des cellules transfectées, en réalisant, sur un échantillon de surnageant, une immunoprécipitation à la protéine A, suivie d'un western-blot.

- *Obtention de la protéine recombinante par immunoprécipitation à la protéine A*

La protéine A est une protéine de 40-60 kDa initialement trouvée dans la paroi de la bactérie *Staphylococcus aureus* qui présente une affinité pour les immunoglobulines (Ig) de mammifères (notamment Homme et souris) et particulièrement la partie Fc des IgG. L'immunoprécipitation a été faite en utilisant le kit commercial EZview™ Red Protein A Affinity Gel (Sigma-Aldrich ; #P6486). Notre protéine recombinante contenant la partie Fc d'une IgG de souris, va se fixer sur la protéine A et peut ainsi être récupérée après centrifugation (**figure 12**). Le culot contenant la protéine recombinante est repris dans du tampon de charge (cf **annexe 1** pour la composition) afin de réaliser un western blot.

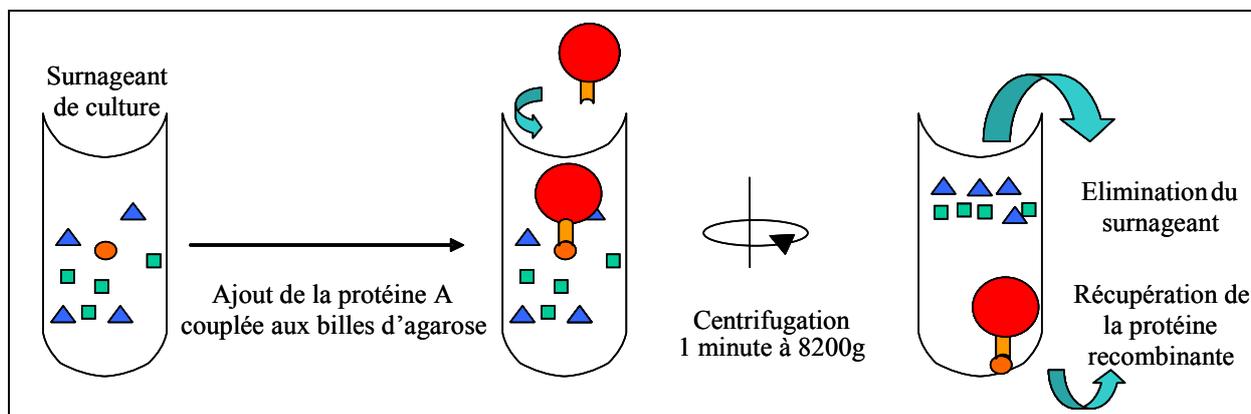


Figure 12. Les différentes étapes pour l'immunoprécipitation à la protéine A.

- *Vérification de la présence de la protéine recombinante dans le précipité par western blot*

Pour vérifier la présence de la protéine recombinante après l'immunoprécipitation du surnageant de culture, nous avons effectué un western-blot. La détection de la protéine recombinante NKp46-Fc, a été faite en utilisant un anticorps anti-Fc couplé à la phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich) (technique détaillée en **annexe 3**).

Résultat :

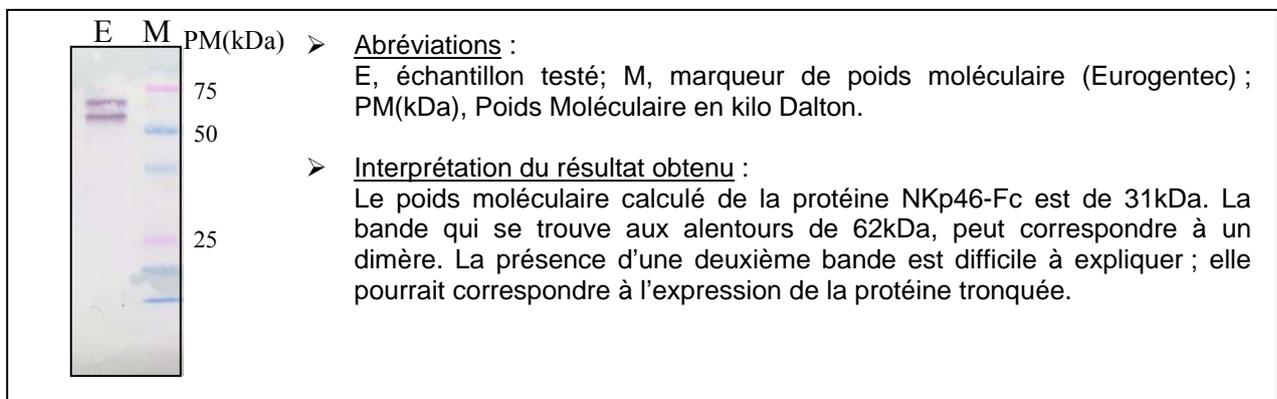


Figure 13. Résultat du western blot réalisé après immunoprécipitation à la protéine A.

Le western-blot nous montre que la protéine de 62kDa présente dans le surnageant de culture, pourrait correspondre à un dimère de la protéine recombinante (**figure 13**). Nous avons donc procédé à la purification de la totalité de la protéine.

2-2- Purification et concentration de la protéine recombinante

La protéine recombinante a été purifiée par chromatographie liquide haute performance (HPLC pour *Hight Performance Liquid Chromatography*), puis dialysée et concentrée afin d'obtenir une solution protéique injectable (techniques détaillées en **annexe 4**).

- *Vérification de la présence et de la pureté de la protéine recombinante*

Avant l'immunisation des souris, un western-blot a été effectué pour vérifier la présence de la protéine dans la solution à injecter. La protéine a été révélée en utilisant l'anticorps anti-Fc couplé à la phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich). Pour s'assurer de la pureté de la protéine,

une coloration au nitrate d'argent a également été effectuée en utilisant un kit commercial (ProteoSilver™, Sigma-Aldrich, #085K6030) qui permet de marquer de manière non spécifique toutes les protéines présentes dans le gel (**figure 14**).

- Résultat :

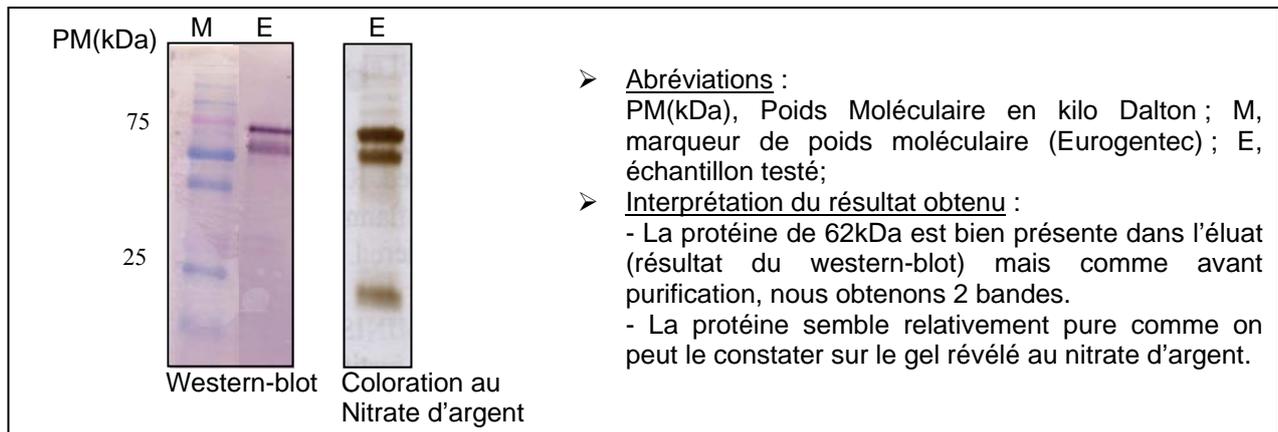


Figure 14. Résultat du western blot et de la coloration au nitrate d'argent réalisés après purification de la protéine sur colonne HPLC

3- Immunisation des souris et analyse de la présence d'anticorps dans le sérum des souris

3-1- Protocole d'immunisation des souris Balb/c

Afin d'avoir un sérum témoin sans anticorps, le jour J0, un prélèvement de sang rétro-orbital (100-200µl) a été effectué sur les cinq souris Balb/c âgées de 6-8 semaines. Le sérum a été récupéré et stocké à -20°C.

- *1^{ère} étape : immunisation génique*

Le même jour (J0), les souris ont reçu une injection intramusculaire de 100µl de cardiotoxine (10µM) dans chacun des muscles du tibia, de façon à générer un foyer inflammatoire. Cinq jours plus tard, les souris ont reçu dans le même muscle, une injection de plasmide pFUSE-Fc contenant la séquence codant pour la portion extracellulaire de la protéine NKp46 caprine (pFUSE-Fc-NKp46Ca) (50µg par patte). Cette injection a été répétée à J17 (**figure 15**).

- 2^{ème} étape : immunisation avec la protéine recombinante

A J34, les souris ont reçu une injection intra péritonéale de la protéine caprine recombinante soluble NKp46-Fc (150µg) en présence d'adjuvant complet de Freund. Quatorze jours plus tard, les souris ont reçu une injection intra péritonéale de la même quantité de protéine mais en présence d'adjuvant incomplet de Freund et à nouveau quinze jours plus tard (**figure 15**).

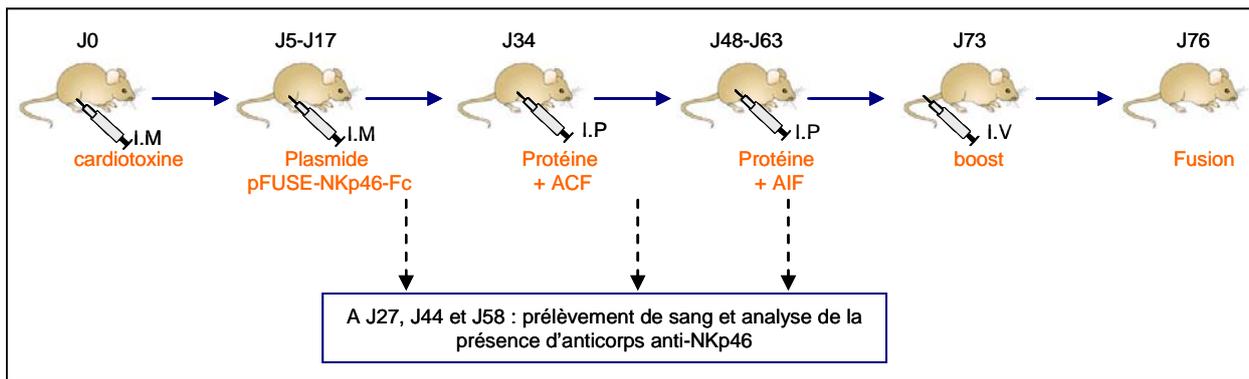


Figure 15. Protocole d'immunisation des souris Balb/c.

Abréviations : I.M, intra-musculaire ; I.P, intra-péritonéale ; I.V, intra-veineux ; ACF, Adjuvant Complet de Freund, AIF, Adjuvant Incomplet de Freund.

3-2- Vérification de la présence d'anticorps dans le sérum des souris

Afin de vérifier que les différentes immunisations ont entraîné la production d'anticorps, des prélèvements de sang ont été effectués 10 jours après chacune des injections réalisées à J17, J34 et J48. La présence d'anticorps dans les différents sérums a été testée par cytométrie en flux (FACS) et western-blot sur des cellules HEK-293T préalablement transfectées avec le plasmide que nous avons nommé p3XFLAG-NKp46-Ca : il s'agit d'un plasmide (N-terminal p3XFLAG-CMV (Sigma-Aldrich)) dans lequel a été insérée la séquence codant pour les parties extracellulaire et transmembranaire de la protéine NKp46 caprine (**figure 16**). Ainsi en utilisant un anticorps anti-FLAG (Sigma-Aldrich), nous avons un contrôle positif, dont le marquage pourra être comparé avec les sérums de souris.

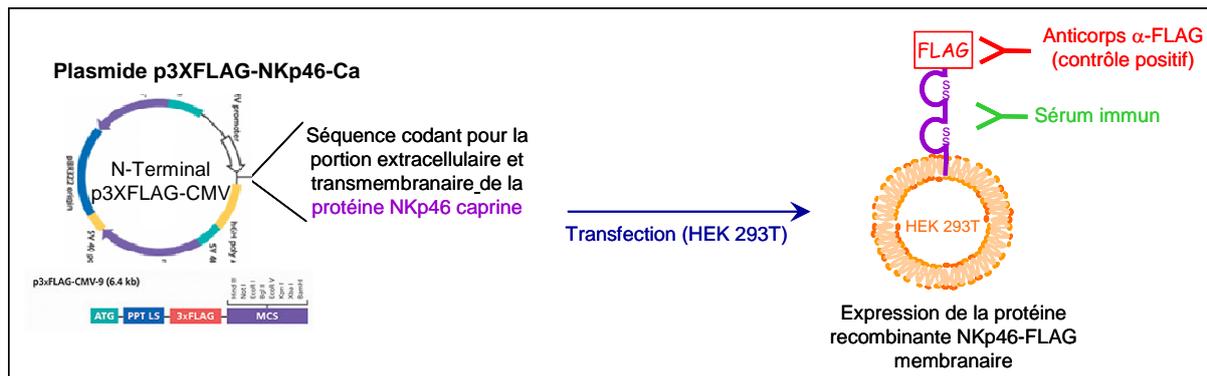


Figure 16. Transfection cellulaire permettant l'expression de la protéine recombinante NKp46-FLAG.

- Vérification de la présence d'anticorps par cytométrie en flux

Les cellules transfectées ont été mises, soit en présence des différents sérums, soit en présence de l'anticorps anti-FLAG (contrôle positif), soit en présence du contrôle isotypique (contrôle négatif). Les cellules ont ensuite été passées au cytomètre en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson) doté du logiciel CellQuest Pro. Le sérum d'une seule souris donnait des résultats similaires à celui du contrôle positif. C'est pourquoi nous ne présenterons que les résultats relatifs à cette souris (**figure 17**).

Résultat :

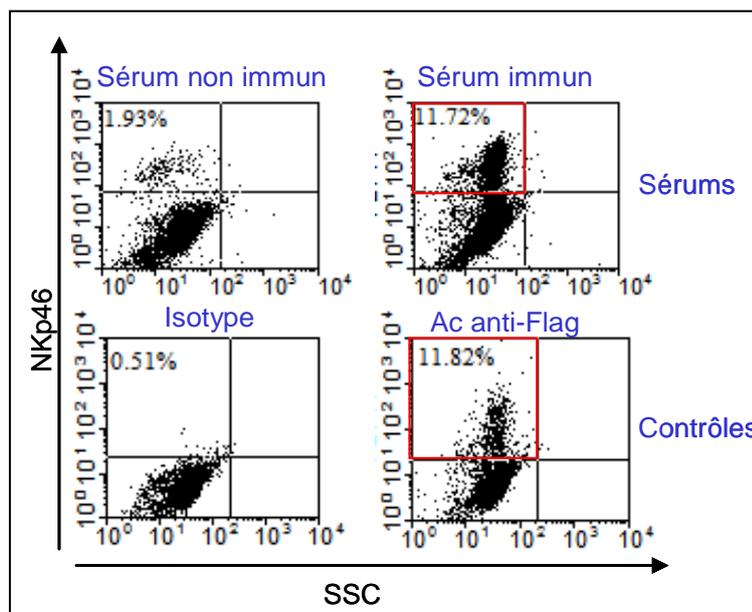


Figure 17. Marquage des cellules transfectées avec le sérum de souris et analyse par cytométrie en flux.

Le pourcentage de cellules marquées par le sérum de la souris est équivalent à celui des cellules marquées par l'anticorps anti-FLAG (quadrants rouges) ce qui montre que les anticorps présents dans le sérum de la souris reconnaissent la protéine NKp46 (**figure 17**).

- *Vérification de la présence d'anticorps par western blot*

Le sérum a également été testé par western blot sur un lysat de cellules HEK-293T transfectées avec le plasmide p3XFLAG-NKp46-Ca (**figure 18**).

Résultat :

Le sérum de la souris contient des anticorps dirigés contre la protéine NKp46.

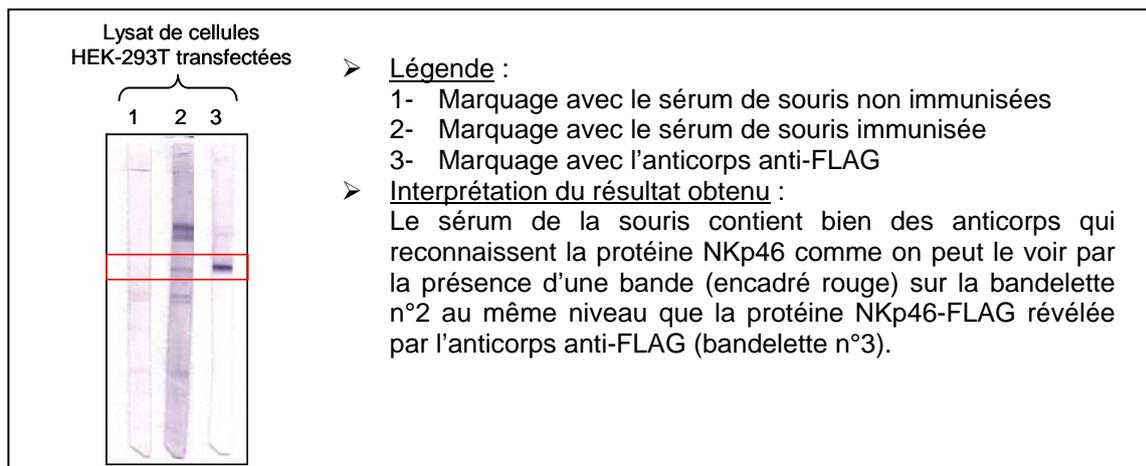


Figure 18. Vérification de la présence d'anticorps anti-NKp46 dans le sérum de la souris par western blot

4- Obtention d'hybridomes produisant des anticorps anti-NKp46

Nous avons suivi la procédure de production d'anticorps monoclonaux (AcM) basée sur la technique des hybridomes mise au point par Köhler et Milstein en 1975 (Kohler and Milstein, 1975).

4-1- Obtention des hybridomes

À J73, la souris a reçu une injection intra veineuse de 20µg de la protéine recombinante NKp46-Fc. Cette injection « boost » permet de stimuler la production d'anticorps. Trois jours plus tard, la souris a été sacrifiée ; la rate a été prélevée et les splénocytes fusionnés avec les cellules de myélome (Sp2/0). La fusion a été réalisée avec l'aide d'E. Esnault, ingénieur de l'équipe « Immunologie Aviaire » (technique détaillée en **annexe 5**).

4-2- Criblage des hybridomes producteurs d'anticorps

- Criblage sur cellules exprimant la protéine recombinante NKp46-FLAG

Les hybridomes ont été criblés par cytométrie en flux sur des cellules HEK-293T transfectées exprimant soit la protéine recombinante membranaire NKp46-FLAG caprine (**figure 11**), soit une protéine recombinante témoin possédant un FLAG, nommée témoin-FLAG (contrôle négatif) (**figure 19**).

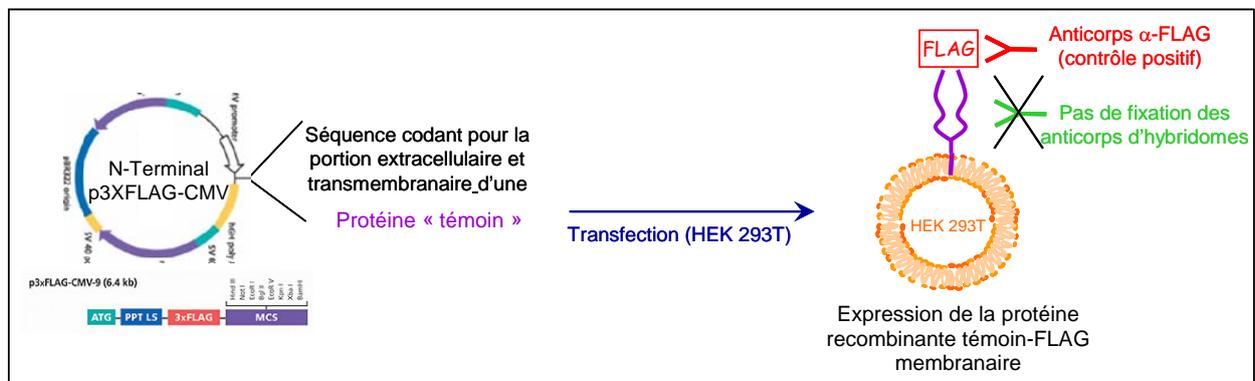


Figure 19. Transfection cellulaire permettant l'expression d'une protéine recombinante témoin

Résultat :

L'analyse des surnageants de culture des hybridomes (**figure 20**) nous a permis de mettre en évidence cinq hybridomes (BD3, DA5, AD5, DB5 et ED5) produisant des anticorps.

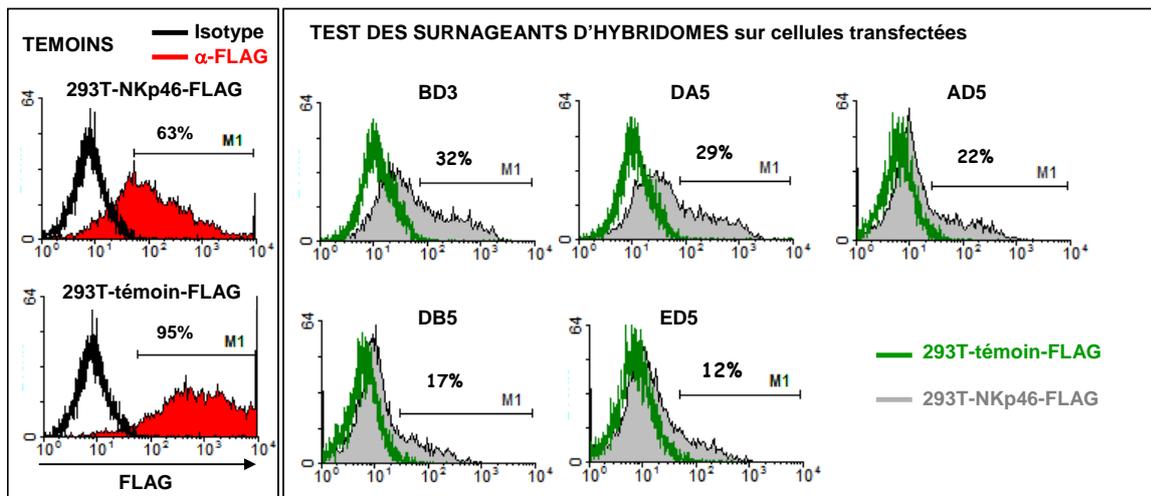


Figure 20. Criblage des hybridomes sur cellules transfectées par cytométrie en flux.

Abréviations : 293T-NKp46-FLAG, cellules HEK-293T exprimant la protéine recombinante « NKp46-FLAG » ; 293T-témoin-FLAG, cellules HEK-293T exprimant une protéine recombinante témoin « témoin-FLAG » (servent de témoin négatif) ; α -FLAG, anticorps anti-FLAG. BD3, DA5, AD5, DB5 et ED5 correspondent aux noms des hybridomes dont les surnageants sont testés sur les cellules exprimant la protéine NKp46-FLAG (histogrammes gris) et sur les cellules exprimant la protéine témoin-FLAG (histogrammes verts).

- *Criblage sur cellules Natural Killer sanguines par cytométrie en flux*

Nous avons voulu vérifier que les surnageants de ces hybridomes étaient également capables de reconnaître des cellules NK purifiées. Nous avons fait l'hypothèse qu'une réaction croisée pourrait avoir lieu avec les cellules NK bovines pour lesquelles un anticorps dirigé contre la protéine NKp46 est disponible (clone AKS1). Nous avons trié positivement des cellules NKp46⁺ du sang périphérique de veaux âgés de 6 à 8 mois via l'utilisation de cet anticorps et des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-souris (dynabeads® pan Mouse IgG, Dynal, #110.41). Les cellules triées ont été cultivées pendant 7-10 jours (cf **annexe 2**), puis utilisées pour le test de criblage en cytométrie en flux (**figure 21**).

Résultat :

La grande majorité des cellules testées étaient marquées par l'anticorps AKS1 (70%) indiquant que les cellules cultivées étaient bien des cellules NK. Parmi les surnageants testés, 3 marquaient les cellules NK bovines (BD3, DA5 et AD5), le marquage le plus important étant obtenu avec l'anticorps BD3. Deux surnageants ne marquaient pas les cellules NK

bovines suggérant que les anticorps produits étaient peut être spécifiques des cellules caprines.

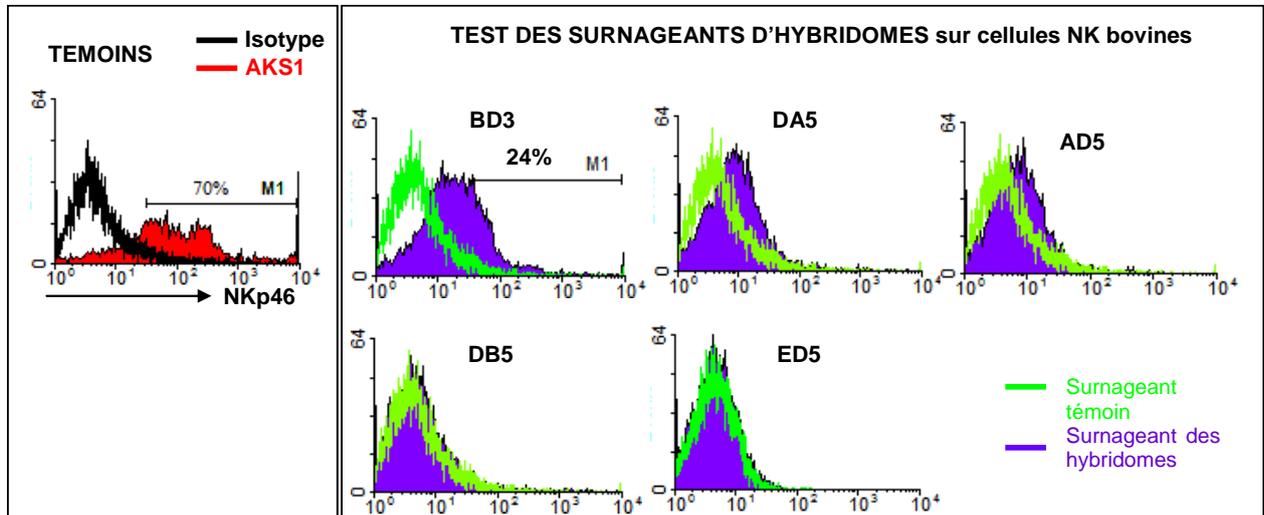


Figure 21. Criblage des hybridomes sur des cellules NKp46⁺ bovines par cytométrie en flux. AKS1 correspond à l'anticorps anti-NKp46 bovin. Le surnageant « témoin » correspond à un mélange de sérums de souris immunisées par le virus de la maladie de Marek (MDV).

- *Criblage des anticorps sur cellules Natural Killer sanguines par western blot*

Les 3 anticorps qui marquaient des cellules NK bovines par cytométrie en flux, ont également été testés en western-blot. Seul BD3 marquait aussi bien des cellules HEK-293T transfectées avec le plasmide p3XFLAG-NKp46-Ca que les cellules NK bovines. Ces résultats sont présentés dans la **figure 22**.

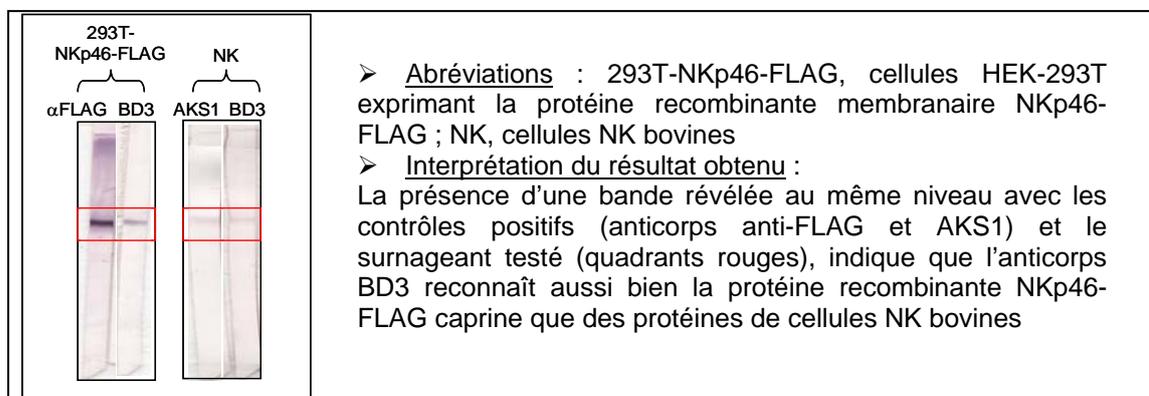


Figure 22. Criblage de l'hybridome BD3 sur cellules transfectées et cellules NK bovines par western blot

Au fur et à mesure du criblage, pour des questions pratiques, les hybridomes avaient été congelés. Après décongélation et mise en culture, l'hybridome BD3 n'a pas proliféré contrairement aux hybridomes DA5 et ED5. Après quelques jours de culture, ils ont été sous-clonés par dilution limite.

4-3- Sous-clonage des hybridomes DA5 et ED5

Chacun des hybridomes a été dilué à une concentration très faible et mis en culture dans de très faibles volumes (plaque 96 puits). La « dilution limite » est telle que la probabilité qu'un puits contienne deux cellules est extrêmement faible. Les îlots de cellules observées résultent avec une quasi certitude de la division d'une seule cellule initiale et sont considérés comme des clones purs.

Les clones ont été criblés comme précédemment, par cytométrie en flux, sur cellules transfectées avec le plasmide p3XFLAG-NKp46-Ca (**figure 23**).

Résultat :

Seuls les clones de l'hybridome DA5 (un seul clone représentatif est présenté) marquaient les cellules transfectées à des taux équivalents à ceux du contrôle positif (anticorps anti-FLAG).

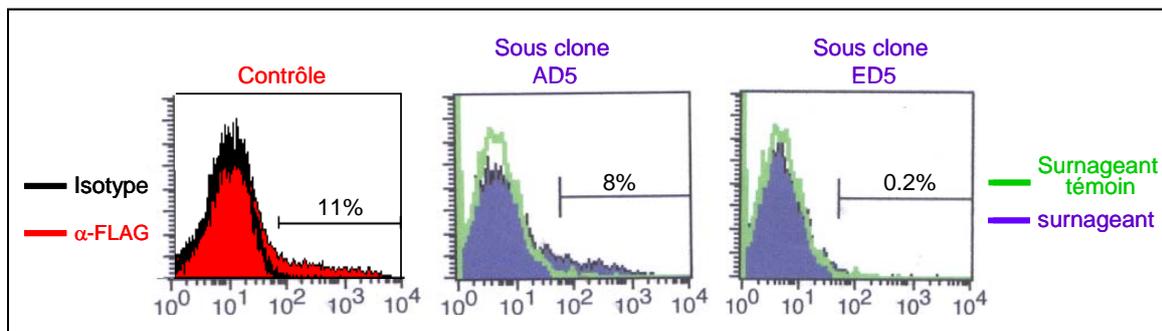


Figure 23. Criblage des sous-clones sur cellules transfectées avec le plasmide p3XFLAG-NKp46-Ca par cytométrie en flux.

Le surnageant « témoin » correspond à un mélange de sérums de souris immunisées par le virus de la maladie de Marek (MDV).

4-4- Détermination de l'isotype de l'anticorps DA5

L'isotype des anticorps produits par les sous-clones de DA5 a été déterminé par ELISA (**figure 24**) avec le kit (Sigma mouse monoclonal antibody isotyping reagent ISO-2). La lecture de la densité optique a été faite à 450nm en utilisant un lecteur de plaque « Thermo labsystem Multiscan Ascent » doté du logiciel Ascent version 2.6.

Résultat :

Les anticorps issus du sous-clonage de l'hybridome DA5 ont l'isotype IgG2b.

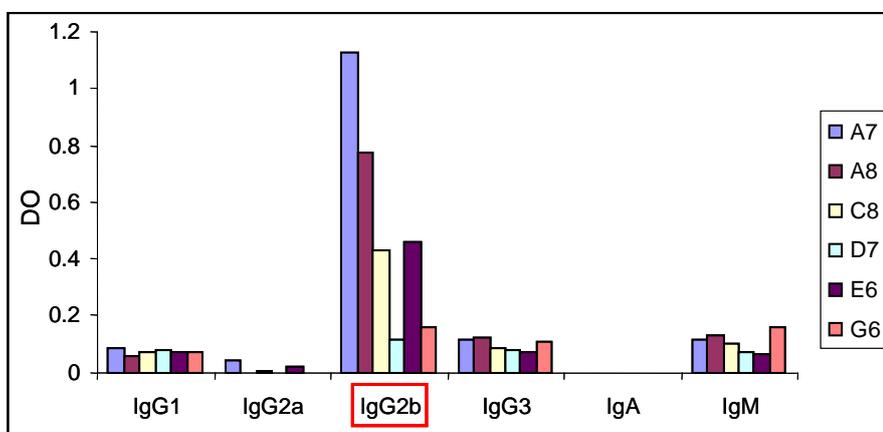


Figure 24. Détermination de l'isotype des anticorps issus du sous-clonage de DA5. A7, A8, C8, D7, E6 et G6 sont les différents anticorps issus du sous clonage de DA5.

4-5- Test de l'anticorps DA5 sur des PBMC

Les anticorps issus du sous-clonage de DA5 ont été testés sur des PBMC caprins et bovins par cytométrie en flux.

Résultat :

Aucun des anticorps (les résultats d'un seul anticorps représentatif sont présentés) ne marquait des cellules parmi les PBMC des différentes espèces testées. Pour les PBMC bovins, nous avons un contrôle positif (l'anticorps AKS1) qui marque 3.5% des PBMC (**figure 25**).

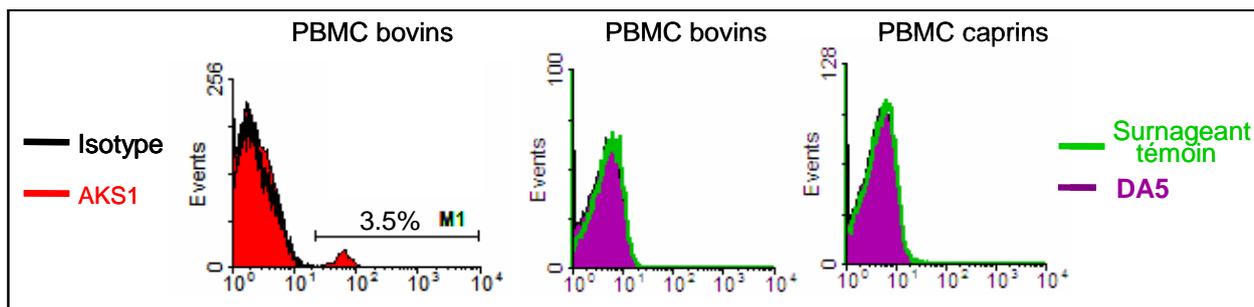


Figure 25. Criblage des anticorps issus du sous-clonage de DA5 sur des PBMC par cytométrie en flux

A l'issue de ces travaux, nous étions donc en possession d'anticorps inutilisables pour une étude sur la biologie des cellules NK caprines.

Article 2

Ovine CD16+/CD14- blood lymphocytes present all the major characteristics of Natural Killer cells

(Veterinary Research, 2010 Jan-Feb;41(1):4)

Présentation de l'article et discussion sur la méthode de tri des cellules NK ovines

Dans le but d'initier une étude sur la caractérisation des cellules NK des petits ruminants, nous avons mis en place une méthode permettant d'isoler et d'étudier les cellules NK de petits ruminants. A côté des récepteurs qui leur sont spécifiques, les cellules NK expriment d'autres récepteurs qui sont également utilisés pour les caractériser. Parmi ceux-ci, le récepteur CD16 (FcγRIII), qui est impliqué dans la cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC, pour *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), est communément utilisé pour définir des sous populations de cellules NK humaines (Cooper et al., 2001). Chez les bovins, un anticorps anti-CD16 humain (clone KD1) (Moretta et al., 1989) croise avec les PBMC et 95% des cellules NK sont CD16 positives (Boysen et al., 2008). Nous avons montré que cet anticorps marque également des populations cellulaires parmi les PBMC ovins mais aucun marquage n'a été observé sur les PBMC caprins (**figure 26**). C'est la raison pour laquelle le travail a été poursuivi sur les ovins

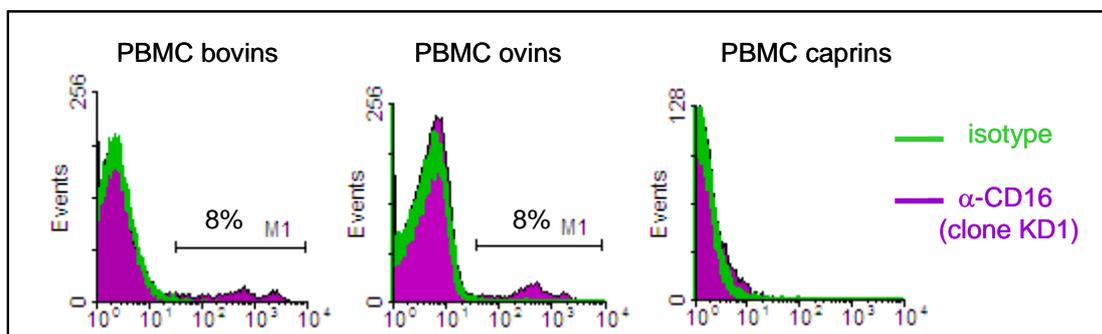


Figure 26. Analyse de la réaction croisée de l'anticorps anti-CD16 humain (clone KD1) avec les PBMC bovins, ovins et caprins par cytométrie en flux.

En réalisant des doubles marquages avec des anticorps dirigés contre les lymphocytes T, B et T-γδ et contre le marqueur CD14, spécifique des monocytes, nous avons montré que le récepteur CD16 n'est exprimé que sur les cellules CD14⁺, CD14^{low} et sur une petite population cellulaire CD14⁻ qui ne correspond pas aux lymphocytes précités. Ceci nous a conduits à émettre l'hypothèse que les cellules CD16⁺/CD14⁻ pourraient correspondre à des cellules NK. Nous avons isolé ces cellules du sang périphérique d'ovins et avons comparé leurs morphologie, phénotype et fonctions avec celles des cellules NK bovines. Nous avons

montré que le pourcentage des cellules CD16⁺/CD14⁻ dans le sang périphérique des ovins est similaire à celui des cellules NK du sang périphérique des bovins. De plus les cellules CD16⁺/CD14⁻ ovines expriment jusqu'à 96 fois plus de transcrits du gène NKp46 que les PBMC et présentent une morphologie de grands lymphocytes granuleux produisant de la perforine, molécule impliquée dans la fonction cytotoxique des cellules NK. Enfin, l'analyse des fonctions des cellules CD16⁺/CD14⁻ ovines a montré que ce sont des cellules cytotoxiques à la fois lors d'un test de lyse médiée par le récepteur CD16 et lors d'une lyse directe contre des cellules cibles ovines. Ces cellules sont également capables de produire de l'IFN- γ de manière dépendante de la dose d'IL-12.

L'ensemble de ces données nous permet de conclure que les cellules CD16⁺/CD14⁻ ovines présentent des caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles similaires à celles des cellules NK bovines. Cette stratégie d'isolement des cellules NK ovines, donne la possibilité d'étudier leur implication dans les maladies infectieuses. De plus, cette stratégie peut être appliquée à d'autres espèces animales pour lesquelles il n'existe pas d'anticorps spécifiques pour les cellules NK. **Ce travail est détaillé dans l'article qui suit.**

Au cours de ce travail, nous avons dû opter pour une méthode de tri et il nous semble intéressant de discuter des raisons du choix de cette méthode par rapport à celles qui sont utilisées chez l'Homme, la souris et les bovins.

De manière générale, deux méthodes sont couramment utilisées pour trier les cellules NK : la **sélection positive** basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les cellules NK. La **sélection négative**, dans laquelle les anticorps utilisés sont dirigés contre les cellules qui coexistent avec les cellules NK afin de les déplerer. Deux techniques sont utilisables pour réaliser ces tris cellulaires : la **cytométrie en flux** (trieur de cellules à grande vitesse) et l'utilisation de **billes magnétiques**.

La séparation cellulaire par billes magnétiques a de nombreux avantages par rapport à la cytométrie en flux : il s'agit d'une méthode simple qui permet la sélection très rapide d'une population cellulaire viable en grande quantité. Cependant, contrairement à la cytométrie en flux, le tri par les billes ne permet pas de réaliser en une seule étape un tri cellulaire basé sur l'utilisation de deux marqueurs, comme c'est le pour les cellules ovines CD16⁺/CD14⁻ (article 2). Néanmoins, l'un des inconvénients majeurs du tri par cytométrie en flux étant sa durée relativement longue, nous avons tenté de réaliser un tri en utilisant des microbilles magnétiques. Nous

avons dans une première étape, déplété les monocytes, les lymphocytes T- $\gamma\delta$, T et B (en utilisant les anticorps anti-CD14, -TcR1-N7 ($\gamma\delta$), -CD5 et -B-B4) par sélection négative et dans un deuxième temps les cellules CD16⁺ ont été isolées de la suspension cellulaire par sélection positive. Ces cellules ont été mises en culture pendant 7-10 jours puis analysées à la fois au point de vue fonctionnel et phénotypique : bien qu'elles aient une activité cytotoxique et qu'elles soient capables de produire de l'IFN- γ de manière équivalente aux cellules triées par cytométrie en flux, ces cellules ne sont pas très pures puisque la préparation cellulaire est contaminée par environ 30% de lymphocytes T- $\gamma\delta$. Ces résultats montrent que la sélection négative a ses limites et ne peut pas toujours être employée, notamment quand une pureté importante des cellules triées est requise. Certains travaux évoquent la possibilité de production d'IFN- γ par les lymphocytes T- $\gamma\delta$ et même des facultés de cytotoxicité (Beetz et al., 2008; Lundberg and Splitter, 2000; Price et al., 2007). Pour que nos résultats et les conclusions ne soient pas sujets à caution, il était très important de travailler avec les populations les plus pures possibles. Ceci nous a conduits à ne pas continuer à utiliser cette méthode de tri par les billes magnétiques. Nous avons donc opté pour la cytométrie en flux pour trier ces cellules, ce qui nous a permis d'obtenir une population cellulaire CD16⁺/CD14⁻ pure à 98%.

Pour isoler les cellules NK bovines (articles 1 et 2), nous avons procédé à une sélection positive en utilisant des billes magnétiques, comme décrit précédemment (Storset et al., 2004). La fixation de l'anticorps au récepteur NKp46 entraîne l'activation des cellules NK (comme nous l'avons montré lors du test de lyse redirigée médiée par NKp46 et par l'augmentation de la production d'IFN- γ suite à l'engagement du récepteur avec l'anticorps (article 1)) mais, puisque les cellules triées sont ensuite cultivées pendant plusieurs jours en présence de cytokines qui les activent avant de tester leurs propriétés phénotypiques et fonctionnelles, l'activation des cellules au moment du tri n'est pas un inconvénient. En ce qui concerne le tri des cellules CD16⁺/CD14⁻ ovines (article 2), la fixation d'anticorps au récepteur CD16 peut entraîner une activation cellulaire mais étant donné que l'anticorps n'est pas lié à une surface (billes) au niveau de sa portion Fc, il n'est pas exclu que la fixation de l'anticorps CD16 n'entraîne pas d'activation (cet aspect est discuté dans la partie « discussion et perspectives» page 129).

Dans certains cas, notamment lors de l'étude fonctionnelle des cellules NK issues d'individus infectés ou lors de l'analyse de l'effet d'un agent stimulant désiré, l'activation cellulaire par le tri peut être problématique. C'est pourquoi, chez l'Homme, certaines études sont faites en utilisant des kits commerciaux de sélection négative qui permettent non seulement de ne pas activer les cellules NK mais également d'obtenir un degré de pureté correct (se rapprochant de celui que l'on obtient avec la sélection positive) ; le tri avec l'anticorps anti-CD56 ne provoque pas non plus l'activation des cellules NK (Warren, 2000). Chez la souris, le tri des cellules NK avec l'anticorps anti-NKR-P1 entraîne l'activation des cellules (Lanier, 2005) ; l'alternative est d'utiliser l'anticorps DX5 qui se lie au récepteur CD49b et qui ne semble pas induire l'activation des cellules NK (Arase et al., 2001). Chez les bovins, une alternative a également été décrite qui correspond à l'isolement des cellules NK par tri négatif (Endsley et al., 2006). Une autre possibilité est d'étudier les fonctions des cellules NK directement au sein d'une population cellulaire hétérogène (sans avoir recours au tri). Dans ce cas, la fonction des cellules NK au repos peut être analysée en utilisant le stimulus voulu. Cette méthode a été testée dans le cas d'une lyse redirigée médiée par NKp46 (Boysen et al., 2008) mais également lors d'un test de production d'IFN- γ après incubation du sang périphérique total soit en présence ou non d'IL-2 et d'IL-12 (Boysen et al., 2006b), soit en présence de protéines d'origine bactérienne (Olsen et al., 2005). Cependant cette méthode ne permet pas de caractériser et d'analyser de manière précise la part revenant aux cellules NK.

Ovine CD16⁺/CD14⁻ blood lymphocytes present all the major characteristics of natural killer cells

Jamila ELHMOUZI-YOUNES¹, Preben BOYSEN², Daniela PENDE³, Anne K. STORSET², Yves LE VERN⁴, Fabrice LAURENT¹, Françoise DROUET^{1*}

¹ INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique,

Laboratoire Contrôle et Immunologie des Maladies Entériques du Nouveau-né, F-37380 Nouzilly, France

² Department of Food safety and Infection Biology, Norwegian School of Veterinary Science, P.O. Box 8146 Dep., N-0033 Oslo, Norway

³ Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Viale Benedetto XV n.10, 16132 Genova, Italy

⁴ INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, Laboratoire de Cytométrie, F-37380 Nouzilly, France

Abstract – Natural killer (NK) cells have a key role in the innate immune response against pathogens because of their cytotoxic properties and production of interferon-gamma (IFN- γ). Some insight into ruminant NK cell biology has been gained through the characterization of bovine NK cells as NKp46⁺/CD3⁻ cells. However, ovine NK cells have been little studied because of the lack of specific antibodies. Most NK cells in humans and cattle express CD16. We found that an antibody against human CD16 that cross-reacts with bovine NK cells also recognizes cell populations in ovine peripheral blood mononuclear cells. Using double labelling with CD14 revealed the same profile as described in other species, and we identified a putative NK cell population. We therefore sorted this ovine CD16⁺/CD14⁻ cell population and tested it for NK cell characteristics. More than 80% of sorted CD16⁺/CD14⁻ cells expressed perforin. After a week of culture in the presence of IL-2 and IL-15, ovine CD16⁺/CD14⁻ cells had become large cells with intra-cytoplasmic granules containing perforin, and the vast majority displayed an activated CD2^{-low}/CD25⁺/CD8⁺ phenotype, as observed for bovine NKp46⁺/CD3⁻ cells. Moreover, these cells expressed transcripts for the NKp46 receptor, and were cytotoxic in a CD16-mediated redirected lysis assay against a murine cell line, P815, and in a direct lysis assay against the ovine cell line, IDO5. Finally, ovine CD16⁺/CD14⁻ cells having expanded for 7 days in culture secreted IFN- γ in response to IL-12 in a dose-dependent manner. Taken together, these findings led us to conclude that the ovine CD16⁺/CD14⁻ lymphocyte sub-population displays the phenotype and functional characteristics of NK cells.

natural killer cell / ovine / perforin / cytotoxicity / interferon-gamma

1. INTRODUCTION

Natural killer (NK) cells are key cells in the innate immune system which provide early resistance to infection and tumour cell invasion through their effector functions that include cytotoxic activity and cytokine production [10, 17, 23]. These cells are widely distributed in the body [22] and during an infection or a

tumour invasion, in response to type I interferons and chemokines, they can migrate to damaged tissues where they will kill cells displaying an abnormal expression of MHC class I, and enter the draining lymph nodes where they interact with dendritic cells and T lymphocytes [11, 31, 46]. They thus influence the development of the adaptive immune response and its Th1 orientation with interferon-gamma (IFN- γ) production [12, 35] which is fundamental for the resolution of many infections by intracellular pathogens.

* Corresponding author: fdrouet@tours.inra.fr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any noncommercial medium, provided the original work is properly cited.

The cytotoxic activity of NK cells and cytotoxic T lymphocytes (CTL) is rapid and efficient and is initiated via two main pathways i.e., those involving the ligation of death receptors or the exocytosis of the granules [9, 13, 42]. Both cell types can release molecules involved in the cytotoxicity process, including perforin, a pore-forming protein, which allows the entrance of different granzymes in the target cell cytoplasm. However, while cytotoxic molecules in CTL are synthesized only after activation following an encounter with their specific antigen [37], cytotoxic granules in NK cells are formed during cell development [25]. Although naive NK cells present these effector molecules, recent studies have shown that they need priming to respond more rapidly and powerfully to infections [7, 18, 28].

The vast majority of studies with NK cells have been performed with human and rodent cells, initially defined as CD3⁻/CD16 (FcγRIII)⁺/CD56⁺ cells and CD3⁻/NK1.1⁺ cells, respectively. NK cells have been much less characterized in other species, because of the lack of specific cell markers [8, 16, 34]. The generation of an antibody against the bovine NKp46 receptor [38] has led to significant progress in understanding NK cells in cattle [1, 4, 14]. In small ruminants such as sheep, only certain NK-like properties have been demonstrated in peripheral blood lymphocytes (PBL) and cells from the endometrium [27, 40, 43]. It was shown that ovine PBL display NK-like cytotoxic activity against human K562 target cells [43] and murine YAK cells [27]. Moreover, the lytic activity of ovine PBL and endometrial cells against a canine D17 cell line infected with bovine herpes virus-1 (BHV-1) was suppressed by perforin inhibitors and by an antibody inhibiting a Function Associated Molecule (FAM) expressed on NK cells of several species [5, 24, 26, 40]. However, no FAM⁺ cells were detected in the peripheral blood of sheep [40], and ovine NK cells have never been isolated and characterized to date.

To fill this gap, we established a strategy based on a combination of surface markers to characterize ovine NK cells. The CD16 (FcγRIII) receptor involved in antibody-dependent

cell-mediated cytotoxicity (ADCC) is commonly used to characterize NK cell subsets; two functionally different subsets of NK cells have been defined in humans, according to the expression of CD16 and CD56 on these cells [10]. In cattle, we demonstrated that an anti-human CD16 mAb (KD1 clone) labels part of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and that 94% of NKp46⁺ cells express CD16 in peripheral blood and 84% in lymph nodes [3]. In the present study, we used this anti-CD16 mAb in combination with other antibodies against different markers, including CD14, to characterize ovine NK cells. Since CD16 is only expressed on CD14⁺ cells and a small population of CD14⁻ cells, which does not correspond to T, B or γδ-T lymphocytes, we hypothesized that ovine CD16⁺/CD14⁻ cells may represent NK cells. We compared the properties of these ovine cells with those of bovine NKp46⁺ cells [38] and found that both populations presented similar morphology, phenotype and effector functions to NK cells.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

The clinically healthy 4- to 8-month-old Préalpes/Île-de-France ewes and 6- to 10-month-old female prime Holstein cattle used in this study were reared in conventional but protected sanitary facilities (PFIE, INRA, F-37380 Nouzilly, France).

2.2. Antibodies

The monoclonal antibodies (mAbs) used in this study were against the following: human CD16 (clone KD1, IgG2a, [30]; clone GRM1, IgG2a, from SouthernBiotech, Birmingham, USA; clone 3G8, IgG1, from Beckman Coulter, Fort Collins, USA), bovine NKp46 (AKS1; IgG1, [38]), bovine CD5 (CC17; IgG1) and sheep CD8 (38.65; IgG2a) from Serotec (Oxford, UK). Bovine CD25 (CACT116A; IgG1), and CD14 (CAM36A; IgG1), B lymphocytes B-B4 (BAQ155A; IgG1), γδ-T lymphocytes TcR1-N7 (86D; IgG1), CD4 (GC50A1; IgM) and CD2 (MUC2A; IgG2a) cross-reacting with ruminant lymphocytes were all from VMRD (Pullman, USA). The anti-human perforin-FITC kit (δG9; IgG2b) was from

BD Biosciences (Le pont de Claix, France). IgG1, IgG2a, IgM mouse isotype controls were from Dako (Golstrup, Denmark). Subtype-specific secondary antibodies conjugated with Tricolor (TC) or R-Phycoerythrin (PE) were from Caltag Laboratories (Cergy Pontoise, France). Goat anti-mouse IgG Fab' secondary antibodies conjugated with Fluo Probe (FP) 488 were from Fluo Probes (Interchim, Montluçon, France) and Alexa Fluor (AF) 594 from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

2.3. Isolation of ovine CD16⁺/CD14⁻ and bovine NKp46⁺ cells from PBMC

Blood samples from sheep and cattle were collected on EDTA vacutainers (BD Biosciences). PBMC were isolated as previously described [38] with the modification that ovine blood was diluted threefold with Alsever buffer (0.1 M D-glucose, 0.027 M sodium citrate, 0.07 M NaCl (pH 6.5)) before being layered on a density gradient (Histopaque $d = 1.077$; Sigma-Aldrich, Lyon, France). Ovine and bovine CD16⁺/CD14⁻ cells were then isolated using a high speed cell-sorter (MoFlo[®] Beckman Coulter, Paris, France) after labelling PBMC with mAbs against CD16 and CD14; the labelling was revealed with subtype-specific secondary antibodies conjugated with PE or TC, respectively. The population isolated was 98% pure. Bovine NKp46⁺ cells were isolated by positive immunomagnetic selection as previously described [14, 38]. The cell purity in all experiments was over 96%.

2.4. Culture of ovine CD16⁺/CD14⁻ cells and bovine NKp46⁺ cells

Bovine NKp46⁺ cells were expanded as previously described [2, 14] in RPMI 1640 medium supplemented with 60 µg/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, non-essential amino acids, 50 µM 2-mercaptoethanol (all from GIBCO, Invitrogen, Eragny-sur-Oise, France), with 10% Foetal Calf Serum (FCS) from Sigma-Aldrich and 100 U/mL recombinant bovine (rb) IL-2 produced as previously described [2]. To expand ovine CD16⁺/CD14⁻ cells, we tested bovine and human cytokines and found that only the addition of 20 ng/mL recombinant human (rh) IL-2 plus 20 ng/mL rhIL-15, (Immuno Tools GmbH, Friesoythe, Germany) to the culture medium allowed the expansion of this cell population. Cells were cultured for 7–10 days in the previously described medium.

2.5. Cytospin preparation – Immunohistochemical analysis

About $3-4 \times 10^5$ freshly isolated PBMC or in vitro expanded cells were washed twice in PBS buffer and spotted on polylysine slides with a cyto centrifuge (Shandon, Runcom, Cheshire, UK). Cells were stained with May-Grünwald-Giemsa (kit RAL, CML, Nemours, France). The spotted bovine NK cells were labelled with the AKS1 antibody revealed by a goat anti-mouse antibody conjugated to AlexaFluor 594 or labelled with anti-human perforin (kit BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol.

2.6. Cell labelling and flow cytometry

Single and multiple labelling of surface receptors was performed on ovine PBMC or CD16⁺/CD14⁻ expanded cells against the molecules: CD16, CD14, CD5, BB4, TcR1-N7, CD4, CD2, CD8 and CD25. Bovine PBMC were double labelled with the anti-CD16 and anti-CD14 mAbs, and bovine CD16⁺/CD14⁻ expanded cells were further labelled with the anti-NKp46 mAb. Subtype-specific secondary antibodies conjugated with TC or PE were used. Intracellular perforin labelling was performed with the perforin-FITC kit (clone $\delta G9$, IgG2b) and the Cytotfix/Cytoperm and Permash solutions from BD Biosciences. The samples were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), equipped with Cellquest[™] Pro software. Cell acquisitions were performed on $2-10 \times 10^4$ viable cells gated in the forward and side scatter plot for the phenotype characterization and on $1.5-2 \times 10^5$ gated ovine lymphocytes for the perforin assay.

2.7. Cytotoxicity assay

For the redirected lysis assay, the cytotoxic activity of ovine CD16⁺/CD14⁻ expanded cells and bovine NKp46⁺ expanded cells was tested against a murine tumor cell line P815 which expresses Fc γ receptors, allowing antibody linking for redirected lysis. The ovine CD16⁺/CD14⁻ cytotoxic activity was also tested in a direct lysis assay against an ovine fibroblast cell line, IDO5 (initially originating from Rhône-Mérieux, kindly provided by C. Leroux, UMR754 INRA-ENVL-UCBL-EPHE, Lyon, France). Target cells were labelled with 5 µM CFDA-SE (Molecular Probes, Invitrogen) in PBS with 0.2% BSA for 10 min followed by the addition of 5 mL cold RPMI and incubation on ice for 5 min.

They were washed three times in RPMI and immediately used in the cytotoxicity assay. For redirected lysis, the target cells were preincubated with undiluted supernatant of the KD1 hybridoma for 5 min. Ovine CD16⁺/CD14⁻ and bovine NKp46⁺ cells were seeded in a 96-well micro plate with a constant number of target cells (50 000) over a range of effector:target (E:T) ratios (4:1, 2:1, 1:1, 0.5:1 and 0.25:1). Cells were incubated in a total volume of 200 μ L RPMI supplemented with 10% FCS for 1.5 h in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Cells were then washed with PBS containing 0.2% BSA, and then incubated in the same buffer containing 3 μ M propidium iodide (PI) (Molecular Probes, Invitrogen) for 10 min at room temperature in the dark, and analyzed immediately. Target cells incubated without NK cells and stained with PI served as controls to measure basal cell death rate. Cell samples were kept on ice until flow cytometry analysis when 2×10^4 target cells were analyzed for each E:T ratio. The percentage of specific lysis was calculated as follows: percentage of deaths of target cells when co-cultured with NK cells minus percentage of spontaneous deaths of target cells.

2.8. IFN- γ ELISA

Ovine CD16⁺/CD14⁻ cells were pre-cultured for 7–10 days in the presence of IL-2 and IL-15 to assess their IFN- γ secretion. Triplicates of 10^5 cells were incubated for 20 h in the presence of different rhIL-12 concentrations (Immuno Tools) (0, 100, 500, 1 000 pg/mL) already tested for bovine NK cells [14]. IFN- γ production in the supernatants was measured by ELISA as previously described [41] using antibody pairs raised against bovine IFN- γ , already reported to recognize ovine IFN- γ [33]. Briefly, Maxisorp plates (NUNC, Roskilde, Denmark) were pre-coated overnight in PBS with an anti-bovine IFN- γ mAb (CC330; IgG1, Serotec), then incubated for 1 h with a blocking buffer containing 0.05% Tween, 1% BSA and 5% sucrose in PBS. A biotinylated anti-bovine IFN- γ mAb (CC302; IgG1, Serotec) was used to detect IFN- γ capture. Concentrations were calculated from a standard dilution curve of purified bovine IFN- γ (Perbio, Brébières, France).

2.9. mRNA extraction and real-time RT-PCR

The expression of NKp46 was detected in ovine cells by real time reverse transcriptase PCR. mRNA was extracted using the Nucleospin RNA II System (Macherey-Nalgen, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol. The amount of purified

mRNA recovered was measured using a NanoDrop spectrophotometer, and then reverse transcribed using oligo (dT) primers and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase, according to the manufacturer's instructions (Eurogentec, Angers, France). Synthesized cDNA was then amplified by real-time PCR. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA levels were used to normalize RNA quantification. mRNA levels for the NKp46 gene were quantified by SYBR Green incorporation using an iCycler thermocycler (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France). The primers used for mRNA quantification were as follows: NKp46 forward: 5'-CCTGTGAAGCTCCTGGTCAA-3' and reverse: 5'-CAGGACAGCCAGGCCAAGC-3'; HPRT forward: 5'-AAACCAAAGATGGTCAAGGT-3' and reverse: 5'-TCTTAGGCTTTGTATTTTGCTT-3'.

3. RESULTS

3.1. Anti-human CD16 mAb labels three subsets of ovine and bovine PBMC

We first analyzed the cross-reactivity of human CD16 mAbs (clones KD1, GRM1 and 3G8) on ovine PBMC and found that only the clone KD1 cross-reacted with ovine PBMC. We found that 7.5–12.6% of ovine PBMC were CD16⁺ and this range was of the same order of magnitude as that observed with bovine PBMC (8–11%) (Tab. I). To find out which lymphocyte subsets express CD16, we double labelled ovine PBMC with the anti-CD16 mAb and anti T, B and $\gamma\delta$ -T lymphocyte markers. Since none of these lymphocyte populations expressed CD16 (Tab. I) we next investigated the expression of CD16 on monocytes that are known to express CD14. Among the CD14-positive cells, two different CD16-positive subsets could be distinguished on both ovine and bovine PBMC. The CD16⁺/CD14^{high} subset, defined as the R1 region, represented the largest subset (2.4–5.9% of ovine and 4.7–7.0% of bovine PBMC) while the CD16⁺/CD14^{low} subset (R2 region) represented only 0.4–1.4% of ovine and 0.2–2.2% of bovine PBMC on the dot plots (Fig. 1A). The May-Grünwald-Giemsa staining on sorted cells revealed that both subsets presented monocyte morphology (data not shown). The last population (R3 region) expressed CD16 but not CD14, and

Table 1. Expression of CD16 on total ovine blood lymphocytes and different lymphocyte subsets. PBMC were double labelled with anti-human CD16 (clone KD1) and anti-CD4, pan T cell (-CD5), B cell (-BB4), $\gamma\delta$ T cell (-TcR1-N7) mAbs. *N* = number of animals investigated.

	CD16 ⁺		CD16 ⁺ /CD5 ⁺	CD16 ⁺ /BB4 ⁺	CD16 ⁺ /TcR1-N7 ⁺	CD16 ⁺ /CD4 ⁺
	Ovine	Bovine				
Median (%)	9.1	10.2	0.1	0.2	0.04	0.3
Range	(7.5–12.6)	(8.1–11)	(0.1–0.3)	(0.04–0.4)	(0.00–0.18)	(0.06–0.5)
<i>N</i>	8	6	6	8	8	8

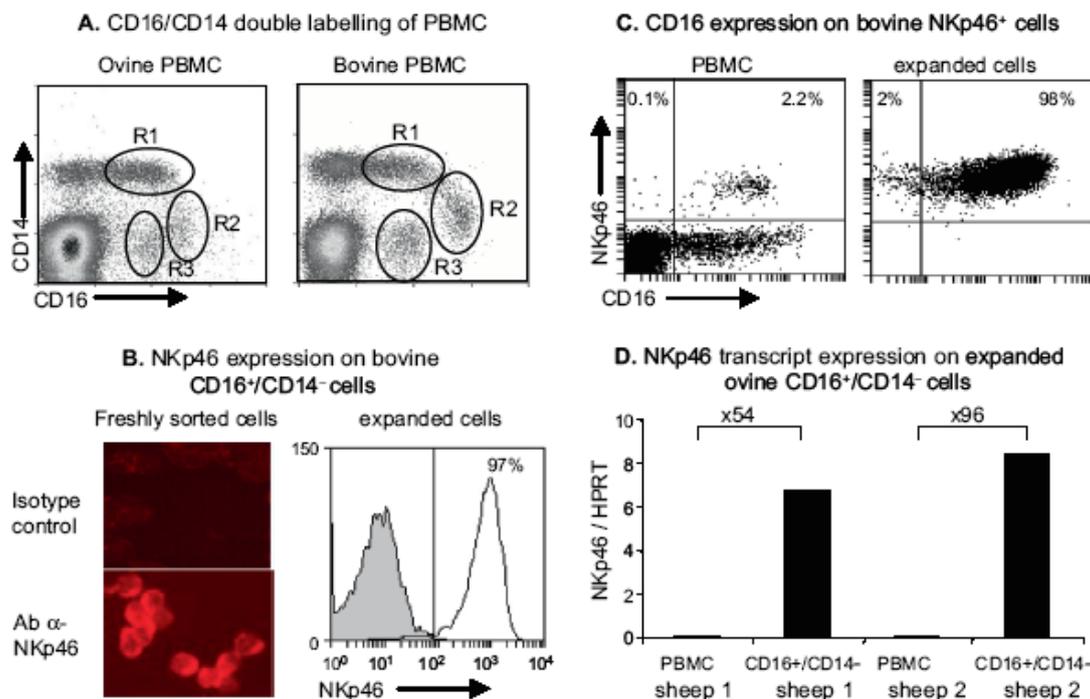


Figure 1. Analysis of CD16 expression on PBMC and NKp46⁺ cells, and NKp46 expression on CD16⁺/CD14⁻ cells. (A) PBMC freshly obtained from sheep and cattle were double labelled with anti-CD16 and anti-CD14 mAbs. Three populations of CD16⁺ cells were defined: the first expressed CD14 at a high level (R1: CD16⁺/CD14^{high}), the second expressed a low level of CD14 (R2: CD16⁺/CD14^{low}), and the last did not express CD14 (R3: CD16⁺/CD14⁻). Data shown are from 1 animal representative of 8 sheep and 4 cattle. (B, left) Freshly sorted bovine CD16⁺/CD14⁻ cells were spotted on slides and labelled with an anti-NKp46 mAb or isotype control mAb. (B, right), bovine expanded CD16⁺/CD14⁻ cells were labelled with the NKp46 mAb (solid line, empty histogram) or the isotype control (shaded histogram); the plot is representative of 2 animals. (C) Bovine PBMC and sorted then expanded NKp46⁺ cells were double labelled with anti-NKp46 and anti-CD16 mAbs and analyzed by flow cytometry. Numbers indicate percentages of positive cells in each quadrant. Data shown are from 1 animal representative of 4. (D) The NKp46 gene transcripts in ovine CD16⁺/CD14⁻ cultured cells or PBMC were quantified by real-time RT-PCR. Values are the relative NKp46 mRNA to HPRT mRNA ratios. Increases (-fold) in the level of NKp46 expression between PBMC and CD16⁺/CD14⁻ cells are indicated above the bars for each animal.

represented 0.9–3.5% of ovine and 0.6–2.7% of bovine PBMC (Fig. 1A). Since the percentages of CD16⁺/CD14⁻ cells were of the same order of magnitude in both species and since it is also reported for humans that the majority of blood NK cells express CD16 [10] but do not express the monocyte marker CD14, we hypothesized that this ovine cell subtype might be NK cells.

3.2. Ovine CD16⁺/CD14⁻ cells are large granular lymphocytes expressing NKp46 and perforin

We first verified that freshly sorted bovine CD16⁺/CD14⁻ cells expressed the NK cell marker NKp46 by immuno-labelling of cytopots (Fig. 1B) and found that more than 95% of the cells expressed this marker. After 7–10 days of expansion, flow cytometry analysis revealed that more than 95% of the cells were still NKp46⁺ (Fig. 1B). We next analyzed the expression of CD16 on bovine NKp46⁺ cells among PBMC and in sorted NKp46⁺ cells expanded in the presence of IL-2. In both cases, more than 95% of the cells expressed CD16 (Fig. 1C), suggesting that bovine NKp46⁺ cells and CD16⁺/CD14⁻ cells are two overlapping populations. Since antibodies against NKp46 are not yet available for sheep, we verified that ovine CD16⁺/CD14⁻ cells expressed NKp46 by real time quantitative RT-PCR. In the two sheep examined, the CD16⁺/CD14⁻ cells represented 3% and 2% of PBMC and, once isolated and expanded in vitro, these cells expressed 54- and 96-fold more NKp46 transcripts respectively than PBMC (Fig. 1D).

Another characteristic of NK cells is the presence of intracellular granules which contain perforin and granzymes involved in the cytotoxicity process. We therefore analyzed the expression of perforin in different ovine PBMC subsets by performing triple labelling with the anti-CD16, anti-CD14 and anti-perforin mAbs (Fig. 2A). Only the CD16⁺/CD14⁻ subset (R3 region) presented clear intracellular staining for perforin, with over 80% of positive cells. In a few CD16⁻/CD14⁻ cells (R4 region), representing less than 2% of this cell population, a lower level of perforin was also detected.

We also verified the morphology of ovine CD16⁺/CD14⁻ cells by comparing them to bovine NKp46⁺ cells. Ovine CD16⁺/CD14⁻ cells expanded as non-adherent cells with prominent lamellipodia (Fig. 2B) as do bovine NKp46⁺ cells. On cytopots stained with May-Grünwald-Giemsa, both ovine CD16⁺/CD14⁻ cells and bovine NKp46⁺ cells were large granular lymphocytes containing acidophilic granules co-localized at one pole of the cell (Fig. 2B). We finally demonstrated by immunocytology that, as for bovine NKp46⁺ cells, the granules of ovine CD16⁺/CD14⁻ cells contained perforin (Fig. 2C).

3.3. The majority of the expanded CD16⁺/CD14⁻ ovine cells present a CD2^{low} CD8⁺ CD25⁺ phenotype

We analyzed the expression of the CD2 and CD25 markers related to proliferation and activation on the expanded ovine CD16⁺/CD14⁻ cells. Two distinct CD2^{low} and CD2⁺ cell populations were observed, with a majority of CD2^{low} cells. Moreover, about 95% of the cells were CD8⁺ and 90% CD25⁺ (Fig. 3).

3.4. Ovine CD16⁺/CD14⁻ cells have cytotoxic properties in direct and redirected lysis assays

The cytotoxic activity of expanded ovine CD16⁺/CD14⁻ cells was investigated by performing a redirected lysis assay using the anti-CD16 antibody and P815 murine target cells which bear an Fc receptor. Both CD16⁺/CD14⁻ ovine cells and NKp46⁺ bovine cells displayed cytotoxic activity against P815 target cells related to the effector to target cell ratio (Fig. 4A). No or low levels of lysis were observed in the presence of the isotype control, indicating the specific involvement of the CD16 receptor in this test.

To study the cytotoxicity of CD16⁺/CD14⁻ ovine cells under more normal physiological conditions, we used a direct lysis assay against the ovine epithelial cell line IDO5. Ovine CD16⁺/CD14⁻ cells displayed cytotoxic activity which increased with the effector to target cell ratio (Fig. 4B).

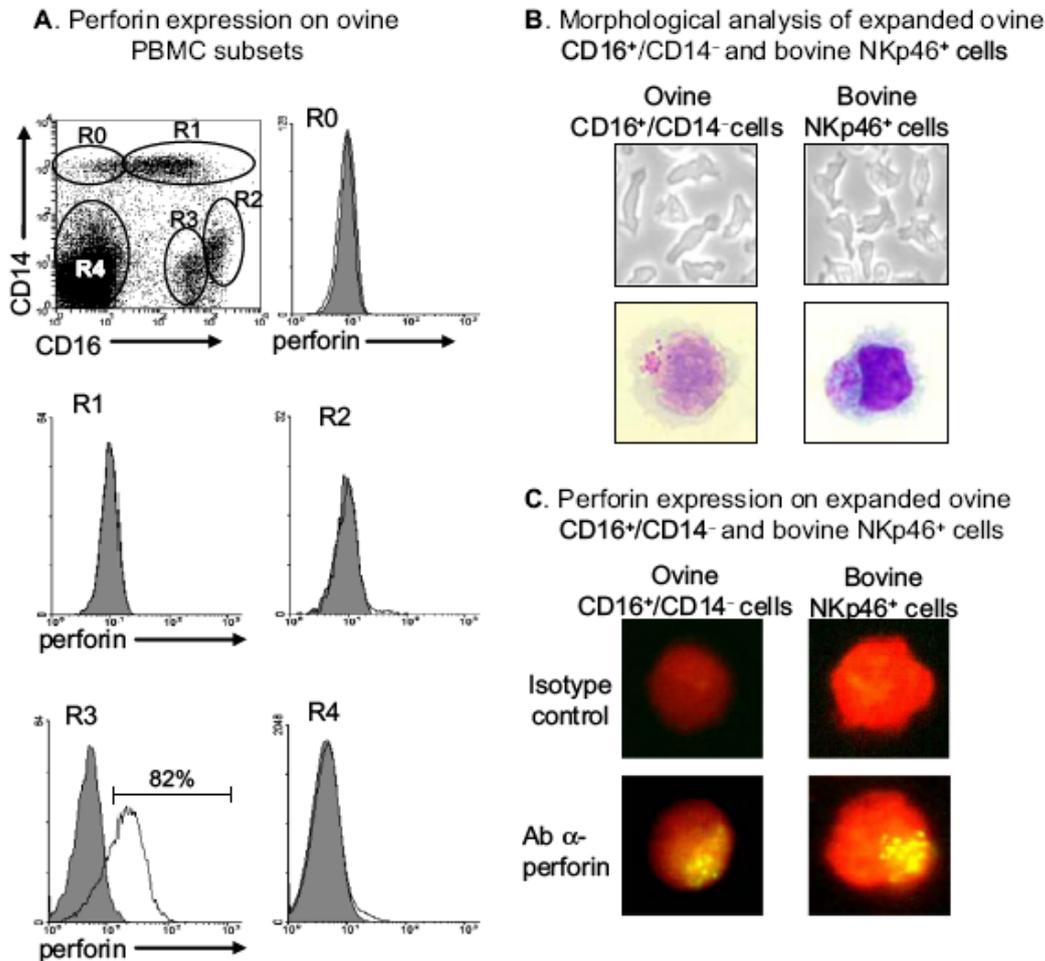


Figure 2. Perforin content and morphology of ovine CD16⁺/CD14⁻ cells; comparison with bovine NKp46⁺ cells. (A) PBMC freshly obtained from sheep were triple labelled with the anti-CD16, anti-CD14 and anti-perforin mAbs: five different subsets (R0 to R4) were analyzed for perforin expression according to CD16 and CD14 expression (solid line, empty histogram). Shaded histograms represent labelling with the isotype control. Data shown are from 1 animal representative of 4. (B, top) Phase-contrast microscopy and (B, bottom) May-Grünwald-Giemsa staining of expanded ovine CD16⁺/CD14⁻ and bovine NKp46⁺ cells. Pictures shown are from 1 culture representative of 6 for ovine cells, and more than 10 for bovine cells. (C) Perforin labelling of expanded ovine CD16⁺/CD14⁻ and bovine NKp46⁺ cells counterstained with Evans blue. The cells shown are from 1 culture representative of 4 for both species.

3.5. Ovine CD16⁺/CD14⁻ cells produce IFN-γ in an IL-12 dose-dependent manner

In addition to cytotoxicity, the production of IFN-γ is another characteristic of NK cells [19]. We therefore assessed the IFN-γ-production by ovine CD16⁺/CD14⁻ cells in the absence or presence of different concentrations of rhIL-12. As shown in Figure 4C,

CD16⁺/CD14⁻ cells produced IFN-γ in an IL-12 dose-dependent manner.

4. DISCUSSION

NK cells have never been characterized in small ruminants. Since antibodies specifically directed against sheep NK cells are not yet

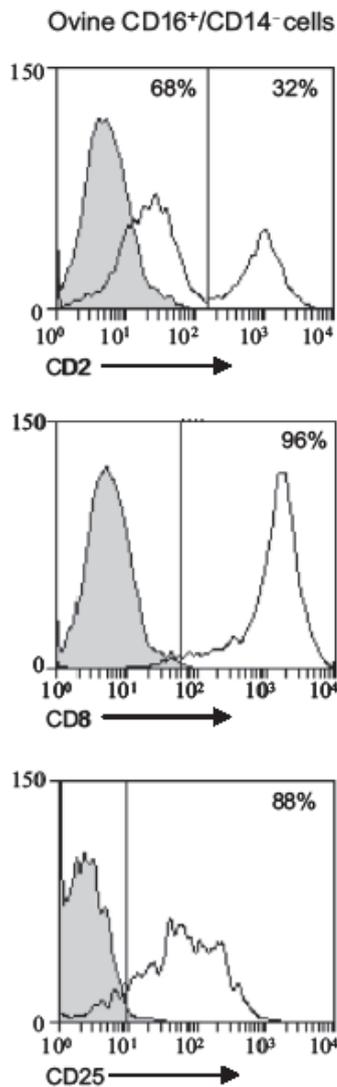


Figure 3. Phenotype of expanded ovine CD16⁺/CD14⁻ cells. Ovine CD16⁺/CD14⁻ cells expanded in the presence of IL-2 and IL-15 were labelled with anti-CD2, -CD8 or -CD25 mAbs (solid lines and white histograms) or with isotype control mAbs (shaded histograms). Data shown are from 1 animal representative of 4. Numbers at the top of histograms indicate the percentages of cells labelled with the antibody indicated among the PBMC in the quadrants.

available, only a few studies have reported on NK-like functional cell properties in PBL or uterine mucosal lymphocytes [15, 27, 40, 43]. The aim of the study presented here was to find a method to purify ovine NK cells from PBMC

based on the combination of cell surface markers. In cattle, NK cells have been described as NKp46⁺/CD3⁻ [38], the majority of which are CD16⁺ cells [3]. We tested the cross-reactivity of three human CD16 (FcγRIII) antibodies with ovine PBMC and found that only the mAb used to identify CD16 on bovine cells (clone KD1) also cross-reacted with ovine PBMC, and the patterns of labelling for ovine cells were similar to those of bovine cells. Indeed, CD16 (FcγRIII) is an important receptor expressed on NK cells in several species. In human blood, about 90% of NK cells express CD16 [10]. CD16 is one of the markers used to define NK cells in the pig [21], and the anti-human CD16 mAb (KD1 clone) identifies around 95% of NK cells from peripheral blood in cattle [3]. However, monocytes can also express this marker at different intensities according to their degree of maturity. Two monocyte subsets, CD16⁺/CD14^{high} and CD16⁺/CD14^{low}, corresponding to maturing and mature monocytes, respectively, have been described in humans [44], and a subset homologous to the human CD16⁺/CD14⁺ population has been identified in the pig and mouse [20, 36, 39]. We performed double labelling with anti-CD16 and anti-CD14 mAbs to distinguish monocytes expressing CD16 from putative NK cells, and this allowed us to identify three different populations. The CD16⁺/CD14^{high} and CD16⁺/CD14^{low} cells had a monocyte morphology on May–Grünwald–Giemsa staining, and most probably correspond to maturing and mature monocytes, respectively, as described in humans by Ziegler-Heitbrock et al. [44, 45]. The third population consisted of CD16⁺/CD14⁻ cells which expressed NKp46 transcripts and was present at a similar proportion as the NKp46⁺ subset in bovine PBMC.

To define the ovine CD16⁺/CD14⁻ population more precisely, we compared its properties with those of CD16⁺/CD14⁻ cells and NKp46⁺ cells isolated from cattle blood. We found that freshly sorted bovine CD16⁺/CD14⁻ cells were all NKp46⁺. This was also the case after 7–10 days' expansion of the bovine cells, and there were neither CD4⁺ nor γδ⁺ T lymphocytes in the culture of CD16⁺/CD14⁻ ovine cells (data

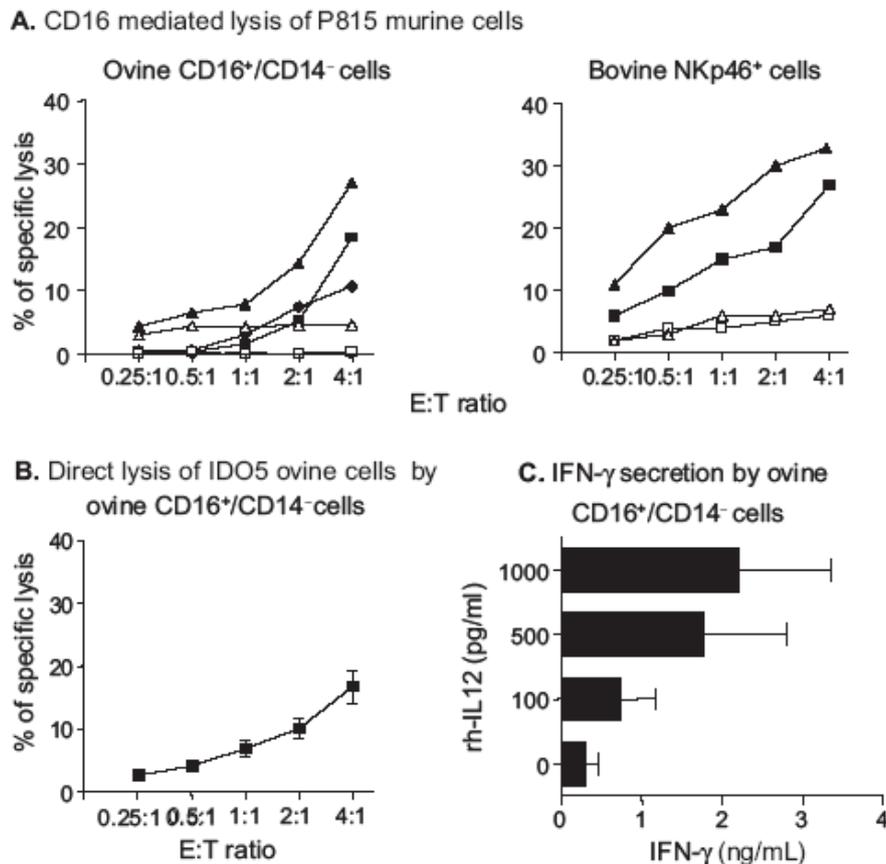


Figure 4. Functional properties of ovine CD16⁺/CD14⁻ cells. (A) CD16-mediated lysis of murine P815 target cells bearing an Fc γ receptor by ovine CD16⁺/CD14⁻ cells or by bovine NKp46⁺ cells in the presence of an anti-human CD16 mAb (KD1 clone) (filled symbols) or its isotype control (open symbols). Data presented are from 3 sheep and 2 cattle. Each symbol represents the cytotoxicity of NK cells from 1 animal. (B) Direct lysis of ovine fibroblast IDO5 target cells by ovine CD16⁺/CD14⁻ cells. Data presented are means \pm SEM from 8 sheep. (C) IFN- γ release in the supernatants of the cultured CD16⁺/CD14⁻ cells after 20 h of stimulation with different levels of rhIL-12. Data shown are means \pm SEM from 6 sheep.

not shown). Moreover, the expanded ovine CD16⁺/CD14⁻ and bovine NKp46⁺ cells had the same morphological characteristics; the cells were large granular lymphocytes which grew in culture as non-adherent cells with prominent lamellipodia, as already described [38]. In addition, more than 80% of CD16⁺/CD14⁻ cells expressed perforin, an important component for NK cell cytotoxic properties. Two percent of the CD16⁺/CD14⁻ population also contained perforin; it cannot be excluded that NK cells were present in this population, though in other species these cells are consid-

ered to be most likely memory [32] or activated [37] CD8⁺ T lymphocytes. Ovine CD16⁺/CD14⁻ cells expressed perforin after in vitro expansion, and most of the cells presented a CD2^{low}/CD8⁺/CD25⁺ phenotype, in agreement with our previous studies on bovine NK cells [2, 3, 14]. Taken together, this first set of findings led us to conclude that the CD16⁺/CD14⁻ population had the morphology and phenotype characteristics of NK cells.

We examined the cytotoxicity of the putative ovine NK cells by two methods. The direct lysis assay evaluates the natural cytotoxicity of

the cells against allogenic targets even though the receptors involved have not been studied. The redirected lysis assay, in which the triggering of NK cells is induced by antibodies against specific receptors, describes the ability of the involved receptor to activate the lysis and the ability of the cells to kill the targets; this test can be more powerful than the direct lysis, depending on the engaged receptor [2, 29, 30]. In the present study, the CD16⁺/CD14⁻ population exhibited cytotoxic activity that was dependent on the effector to target cell ratio, both in a CD16-mediated redirected lysis assay against a murine cell line and in a direct lysis assay against the IDO5 ovine cell line. These results were in line with results previously reported for bovine NK cells [2, 3, 14]. Nevertheless, the activation of a natural cytotoxicity receptor (NCR) such as NKp46 leads to a stronger cytotoxicity than the CD16 receptor activation [3]. However, the level of cytotoxicity of the ovine CD16⁺/CD14⁻ cells did not seem very high, which could be explained by a low expression of receptors such as NCR and (in the case of a direct allogenic lysis) by the lineage of the target line (ovine IDO5 fibroblasts).

NK cells produce IFN- γ in response to infection, and this secretion may be dependent on stimulation by cytokines such as IL-12 produced by dendritic cells [19]. We found that ovine CD16⁺/CD14⁻ cells produced IFN- γ in an IL-12 dose-dependent manner. However, we noted that in the same conditions of IL-12 stimulation ovine cells produced about 10-fold less IFN- γ than previously reported for bovine NKp46⁺ cells [14]. The difference observed might be due to the cytokines used to expand the cells (IL-2 for bovine cells versus IL-2 plus IL-15 for ovine cells). Indeed, in a previous study we showed that bovine NKp46⁺ cells expanded in the presence of IL-15 produced no or very little IFN- γ , whatever the IL-12 concentration used to stimulate them, while IL-2-expanded bovine NKp46⁺ cells produced large amounts of IFN- γ in an IL-12 dose-dependent manner [14]. We compared the IFN- γ production by ovine cells expanded in the presence of IL-2 alone or IL-2 plus IL-15 for the last three days but we could not detect any

difference (data not shown). Another possibility could also be a difference in sensitivity of the ELISA quantification because of the use of antibodies produced against bovine IFN- γ to detect ovine IFN- γ or the use of heterologous rhIL-12.

In conclusion, we show that ovine CD16⁺/CD14⁻ cells have morphological and functional characteristics similar to those of bovine NK cells. The possibility of isolating and growing pure ovine NK cell cultures provides an important opportunity to study the involvement of ovine NK cells in emerging infectious diseases such as Bluetongue [6]. Moreover, this strategy for isolation of NK cells might be applied to other species for which NK antibodies are not yet available.

Acknowledgements. We thank T. Chaumeil, R. Gelineau, D. Leguéré, M. Maillon, C. Mouazé, D. Serreau (INRA PFIE) for the blood samples, D. Raine (Dorking, Surrey, UK) for revising the manuscript, and D. Kerboeuf (INRA, Cytometry laboratory) for advice. We thank H. Watier (Faculty of medicine, Tours, France) for providing antibody samples. This work was supported by INRA and Région Centre (fellowship to J. Elhmouzi-Younes) and EGIDE (Aurora project 15824YG and 181604/V11).

REFERENCES

- [1] Boysen P., Klevar S., Olsen I., Storset A.K., The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts, *Infect. Immun.* (2006) 74: 953–960.
- [2] Boysen P., Olsen I., Berg I., Kulberg S., Johansen G.M., Storset A.K., Bovine CD2⁻/NKp46⁺ cells are fully functional natural killer cells with a high activation status, *BMC Immunol.* (2006) 7:10.
- [3] Boysen P., Gunnes G., Pende D., Valheim M., Storset A.K., Natural killer cells in lymph nodes of healthy calves express CD16 and show both cytotoxic and cytokine-producing properties, *Dev. Comp. Immunol.* (2008) 32:773–783.
- [4] Boysen P., Storset A.K., Bovine natural killer cells, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2009) 130:163–177.
- [5] Camenisch T.D., Jaso-Friedmann L., Evans D.L., Harris D.T., Expression of a novel function-associated molecule on cells mediating spontaneous cytotoxicity in swine, *Dev. Comp. Immunol.* (1993) 17:277–282.

- [6] Carpenter S., Wilson A., Mellor P.S., Culicoides and the emergence of Bluetongue virus in northern Europe, *Trends Microbiol.* (2009) 17:172–178.
- [7] Chaix J., Tessmer M.S., Hoebe K., Fuseri N., Ryffel B., Dalod M., et al., Cutting edge: priming of NK cells by IL-18, *J. Immunol.* (2008) 181:1627–1631.
- [8] Charley B., Fradelizi D., Differential effects of human and porcine interleukin 2 on natural killing (NK) activity of newborn piglets and adult pigs lymphocytes, *Ann. Rech. Vet.* (1987) 18:227–232.
- [9] Chavez-Galan L., Arenas-Del Angel M.C., Zenteno E., Chavez R., Lascurain R., Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes, *Cell Mol. Immunol.* (2009) 6:15–25.
- [10] Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A., The biology of human natural killer-cell subsets, *Trends Immunol.* (2001) 22:633–640.
- [11] Cooper M.A., Fehniger T.A., Fuchs A., Colonna M., Caligiuri M.A., NK cell and DC interactions, *Trends Immunol.* (2004) 25:47–52.
- [12] Corthay A., A three-cell model for activation of naive T helper cells, *Scand. J. Immunol.* (2006) 64:93–96.
- [13] Cullen S.P., Martin S.J., Mechanisms of granule-dependent killing, *Cell Death Differ.* (2008) 15:251–262.
- [14] Elh mouzi-Younes J., Storset A.K., Boysen P., Laurent F., Drouet F., Bovine neonate natural killer cells are fully functional and highly responsive to interleukin-15 and to NKp46 receptor stimulation, *Vet. Res.* (2009) 40:54.
- [15] Entrican G., Wheelhouse N.M., Immunity in the female sheep reproductive tract, *Vet. Res.* (2006) 37:295–309.
- [16] Evans D.L., Jaso-Friedmann L., Natural killer (NK) cells in domestic animals: phenotype, target cell specificity and cytokine regulation, *Vet. Res. Commun.* (1993) 17:429–447.
- [17] Farag S.S., Caligiuri M.A., Human natural killer cell development and biology, *Blood Rev.* (2006) 20:123–137.
- [18] Fehniger T.A., Cai S.F., Cao X., Bredemeyer A.J., Presti R.M., French A.R., Ley T.J., Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs, *Immunity* (2007) 26:798–811.
- [19] Ferlazzo G., Pack M., Thomas D., Paludan C., Schmid D., Strowig T., et al., Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) 101:16606–16611.
- [20] Geissmann F., Jung S., Littman D.R., Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties, *Immunity* (2003) 19:71–82.
- [21] Gemer W., Kaser T., Saalmuller A., Porcine T lymphocytes and NK cells – an update, *Dev. Comp. Immunol.* (2009) 33:310–320.
- [22] Gregoire C., Chasson L., Luci C., Tomasello E., Geissmann F., Vivier E., Walzer T., The trafficking of natural killer cells, *Immunol. Rev.* (2007) 220:169–182.
- [23] Hamerman J.A., Ogasawara K., Lanier L.L., NK cells in innate immunity, *Curr. Opin. Immunol.* (2005) 17:29–35.
- [24] Harris D.T., Jaso-Friedmann L., Devlin R.B., Koren H.S., Evans D.L., Identification of an evolutionarily conserved, function-associated molecule on human natural killer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:3009–3013.
- [25] Kam C.M., Hudig D., Powers J.C., Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta* (2000) 1477:307–323.
- [26] Kapur R., Evans D.L., Harris D.T., Evolutionary conservation of a human function-associated molecule on murine natural killer cells: expression and function, *Scand. J. Immunol.* (1994) 40:50–56.
- [27] Liu W.J., Hansen P.J., Effect of the progesterone-induced serpin-like proteins of the sheep endometrium on natural killer cell activity in sheep and mice, *Biol. Reprod.* (1993) 49:1008–1014.
- [28] Lucas M., Schachterle W., Oberle K., Aichele P., Diefenbach A., Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15, *Immunity* (2007) 26:503–517.
- [29] Melioli G., Prigione I., Merli A., Cantoni C., Chen Q., Machi A.M., Ferrini S., Induction of functional activities of human lymphocytes by monoclonal antibodies, *Ann. Ist. Super. Sanita* (1991) 27:79–85.
- [30] Moretta A., Tambussi G., Ciccone E., Pende D., Melioli G., Moretta L., CD16 surface molecules regulate the cytolytic function of CD3CD16⁺ human natural killer cells, *Int. J. Cancer* (1989) 44:727–730.
- [31] Moretta A., Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues, *Nat. Rev. Immunol.* (2002) 2:957–964.
- [32] Niiya H., Sakai I., Lei J., Azuma T., Uchida N., Yakushijin Y., et al., Differential regulation of perforin

- expression in human CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes, *Exp. Hematol.* (2005) 33:811–818.
- [33] Pedersen L.G., Castelruiz Y., Jacobsen S., Aasted B., Identification of monoclonal antibodies that cross-react with cytokines from different animal species, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2002) 88: 111–122.
- [34] Piriou-Guzylack L., Salmon H., Membrane markers of the immune cells in swine: an update, *Vet. Res.* (2008) 39:54.
- [35] Raulat D.H., Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response, *Nat. Immunol.* (2004) 5:996–1002.
- [36] Sanchez C., Domenech N., Vazquez J., Alonso F., Ezquerro A., Dominguez J., The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation, *J. Immunol.* (1999) 162:5230–5237.
- [37] Shresta S., Pham C.T., Thomas D.A., Graubert T.A., Ley T.J., How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?, *Curr. Opin. Immunol.* (1998) 10:581–587.
- [38] Storset A.K., Kulberg S., Berg I., Boysen P., Hope J.C., Dissen E., NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics, *Eur. J. Immunol.* (2004) 34:669–676.
- [39] Sunderkotter C., Nikolic T., Dillon M.J., Van Rooijen N., Stehling M., Drevets D.A., Leenen P.J., Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response, *J. Immunol.* (2004) 172:4410–4417.
- [40] Tekin S., Hansen P.J., Natural killer-like cells in the sheep: functional characterization and regulation by pregnancy-associated proteins, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) (2002) 227:803–811.
- [41] Tourais-Esteves I., Bernardet N., Lacroix-Lamande S., Ferret-Bernard S., Laurent F., Neonatal goats display a stronger TH1-type cytokine response to TLR ligands than adults, *Dev. Comp. Immunol.* (2008) 32:1231–1241.
- [42] Trapani J.A., Smyth M.J., Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway, *Nat. Rev. Immunol.* (2002) 2:735–747.
- [43] Tuo W., Ott T.L., Bazer F.W., Natural killer cell activity of lymphocytes exposed to ovine, type I, trophoblast interferon, *Am. J. Reprod. Immunol.* (1993) 29:26–34.
- [44] Ziegler-Heitbrock H.W., Fingerle G., Strobel M., Schraut W., Stelter F., Schutt C., et al., The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages, *Eur. J. Immunol.* (1993) 23:2053–2058.
- [45] Ziegler-Heitbrock L., The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation, *J. Leukoc. Biol.* (2007) 81:584–592.
- [46] Zitvogel L., Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity, *J. Exp. Med.* (2002) 195:F9–F14.

Discussion générale et perspectives

Chez les bovins la majeure partie des travaux réalisés sur les cellules NK concerne des animaux âgés de plusieurs mois à plusieurs années. Dans cette thèse, lors de la caractérisation des cellules NK des veaux nouveau-nés (article 1), **nous avons observé des différences fonctionnelles des cellules NK en fonction des cytokines utilisées pour les cultiver mais également en fonction de l'âge de l'animal ; il nous semble intéressant de les discuter de façon plus approfondie.**

Chez les ovins, nous avons développé une stratégie pour isoler et caractériser les cellules NK ovines (article 2). Ceci nous conduit à discuter **des définitions et fonctions alternatives des cellules NK en fonction des espèces.**

Enfin, dans une dernière partie, **nous envisagerons les perspectives d'étude des cellules NK bovines *in-vitro* dans un contexte infectieux et d'utilisation du mouton comme modèle pour étudier l'implication des cellules NK lors d'une réponse immunitaire anti-infectieuse *in-vivo*.**

I- Importance des cytokines utilisées pour stimuler les cellules NK

Dans l'article 1, nous avons réalisé une étude comparative entre les cellules NK de veaux nouveau-nés et de veaux plus âgés après isolement et culture des cellules soit en présence d'IL-2, soit en présence d'IL-15. Ces deux cytokines présentent des propriétés très semblables, en particulier du fait que leurs récepteurs partagent les mêmes sous unités β et γ (Carson et al., 1994) ; elles sont notamment impliquées dans le développement, la prolifération et l'activation des cellules NK. Toutefois, elles peuvent également présenter des fonctions distinctes. Il a été montré que l'IL-2 est impliquée dans l'élimination des lymphocytes T auto-réactifs alors que l'IL-15 est décrite comme étant un facteur anti-apoptotique. En particulier, chez des souris transgéniques surexprimant l'IL-15, l'élimination des lymphocytes T auto-réactifs induite par l'IL-2 est inhibée. De plus, l'IL-15 permet le maintien des lymphocytes T mémoires ($CD8^+/CD44^{hi}$) (Waldmann, 2006). D'autre part des souris déficientes pour l'IL-2 ou pour la chaîne α du récepteur à l'IL-2 présentent une hypertrophie des organes lymphoïdes secondaires ainsi qu'une expansion clonale des lymphocytes T et B associées à des maladies auto-immunes. Parallèlement, des souris déficientes pour l'IL-15 ou pour la chaîne α du récepteur à l'IL-15 présentent un nombre réduit de cellules NK et de lymphocytes T mémoires ($CD8^+/CD44^{hi}$) (Waldmann, 2006).

L'effet anti-apoptotique particulier à l'IL-15 permet une survie cellulaire plus longue des cellules NK (Becknell and Caligiuri, 2005; Carson et al., 1997). Nous avons remarqué cet effet lors de nos expérimentations en effectuant des numérations de cellules NK cultivées soit en présence d'IL-2 soit en présence d'IL-15. Quel que soit l'âge des veaux, les cellules NK cultivées en présence d'IL-15 avaient une longévité supérieure et proliféraient pendant toute la période de culture testée (13 jours). En revanche, les cellules NK cultivées en présence d'IL-2 présentaient un taux de prolifération moins important corrélé avec la présence de cellules mortes à partir du 6^{ème} jour de culture (**figure 27**). Néanmoins pour vérifier si la plus faible mortalité observée dans les cultures en présence d'IL-15 est bien due au pouvoir anti-apoptotique de l'IL-15 il serait intéressant de faire un marquage à l'Annexine V. De plus, il serait intéressant de poursuivre la culture des cellules NK en présence d'IL-15 au delà de 13 jours pour déterminer la longévité des cellules NK dans ces conditions de culture. Chez l'Homme une étude a montré que des cellules NK isolées du sang (du cordon ou d'adultes) pouvaient être maintenues plus de 10 semaines en culture en présence d'IL-15 (Choi et al., 2004).

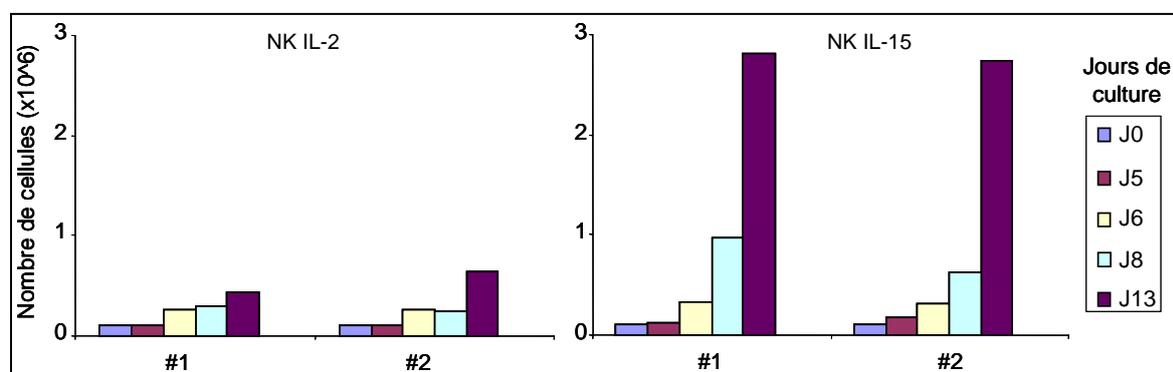


Figure 27. Mesure de la prolifération des cellules NK bovines cultivées en présence d'IL-2 ou en présence d'IL-15.

Abréviations : NK IL-2 et NK IL-15, cellules NK cultivées en présence de 100U/ml d'IL-2 recombinante bovine ou en présence de 10ng/ml d'IL-15 recombinante humaine respectivement ; #1, veau âgé de 10 mois ; #2, veau âgé de 6 jours). A J0, les cellules ont été ensemencées à raison de 1×10^5 cellules par puits. Les cellules vivantes ont été comptées tous les 1-5 jours après coloration au bleu trypan.

La constatation d'effets opposés de l'IL-2 et de l'IL-15 *in-vivo* et *in-vitro*, nous amène à soulever une question importante : comment deux cytokines dont les récepteurs présentent des sous unités en commun, peuvent-elles avoir des fonctions distinctes ? Plusieurs explications

sont proposées dans la littérature (Waldmann, 2006) : bien que le déclenchement de la voie de signalisation par les deux récepteurs implique les mêmes molécules (JAK1, JAK3 et STAT5), les deux cytokines induiraient en plus, le déclenchement de voies de signalisation d'autres récepteurs. En effet, l'induction de la prolifération de lymphocytes T par l'IL-15 passe par le récepteur FKBP12 alors qu'elle est indépendante de ce récepteur dans le cas de l'IL-2. L'effet opposé des deux cytokines pourrait également s'expliquer par un effet différent sur les niveaux d'expression de la sous unité α de chacun des récepteurs. En effet, l'exposition de cellules à l'IL-2 induit une augmentation de l'expression de l'IL-2R α alors que l'exposition de cellules à l'IL-15 induit une diminution de l'expression de l'IL-15R α . Enfin, une autre explication possible est qu'*in-vivo*, l'IL-2 qui est exprimée sous forme soluble, s'associe avec une forte affinité à son récepteur trimérique préformé, exprimé à la surface des lymphocytes et composé des sous unités : IL-2R α , IL-2/15R β et IL-2/15R γ c. Contrairement à l'IL-2, l'IL-15 est surtout présente sous forme membranaire liée avec une forte affinité à la sous unité α du récepteur à l'IL-15 (IL-15R α), exprimée à la surface des cellules dendritiques (Mortier et al., 2008). L'association du complexe l'IL-15 / IL-15R α d'un côté et du dimère (IL-2/15R β et IL-2/15R γ c) présent à la surface des lymphocytes activés induit ainsi l'activation du récepteur.

Au cours de cette étude, nous avons également remarqué les effets différents des deux cytokines sur les capacités fonctionnelles des cellules NK. En ce qui concerne la production d'IFN- γ , les cellules NK cultivées en présence d'IL-15, ne produisaient pas ou très peu d'IFN- γ alors que les cellules cultivées en présence d'IL-2 produisaient de l'IFN- γ de manière dépendante de la concentration en IL-12. Contrairement aux cellules NK bovines, les cellules NK humaines stimulées avec de l'IL-12 en présence d'IL-15 sont capables de sécréter de l'IFN- γ à des taux similaires à ceux obtenus avec les cellules NK stimulées par l'IL-12 en présence d'IL-2 (Carson et al., 1994; Gosselin et al., 1999; Warren et al., 1996). Chez la souris, la présence de cellules NK dans la cavité péritonéale et le foie de souris infectées avec *Salmonella choleraesuis* est fortement réduite après administration d'anticorps neutralisants anti-IL-15 *in-vivo* ; cette diminution est corrélée avec une forte baisse de production d'IFN- γ , suggérant l'importance de l'IL-15 dans le mécanisme de protection médiée par les cellules NK (Fehniger et al., 2000; Hirose et al., 1999). Cela nous laisse penser que les mécanismes d'activation des cellules NK diffèrent entre les espèces. Néanmoins, nous avons constaté que les cellules NK des nouveau-nés stimulées avec de l'IL-12 et un anticorps anti-NKp46, sont

capables de produire de l'IFN- γ qu'elles soient cultivées en présence d'IL-2 ou d'IL-15. De plus, les cellules NK des veaux nouveau-nés présentent une activité cytotoxique plus importante que celle des veaux plus âgés lorsqu'elles ont été cultivées en présence d'IL15, que le récepteur NKp46 soit stimulé (lyse redirigée) ou non (lyse directe) et quelle que soit la cytokine avec laquelle elles ont été cultivées au préalable. Ces résultats mettent en évidence deux particularités des cellules NK des nouveau-nés : d'une part leur capacité à mieux répondre à l'IL-15 et d'autre part leur capacité à mieux répondre à la stimulation de leur récepteur NKp46 qui pourrait être due en partie à la plus grande expression de ce récepteur à leur surface. Il est également possible que cette différence de réponse entre les cellules NK des nouveau-nés et des veaux plus âgés soit due à une différence d'expression ou de signalisation du récepteur à l'IL-15 et du récepteur NKp46 en fonction de l'âge. En effet, des études chez la souris ont montré que les macrophages de nouveau-nés et d'adultes expriment différemment certaines molécules de signalisation des TLR telles que p38 α -MAPK et ceci est lié à une différence de réponse de ces cellules à des ligands de TLR (Chelvarajan et al., 2007). Chez l'homme, les cellules NK du sang de cordon cultivées en présence d'IL-15 présentent également une forte activité cytotoxique (Choi et al., 2004; Lin et al., 2004; Lin et al., 2000). De plus, le récepteur NKp46 est également plus exprimé par les cellules NK du sang de cordon et d'enfants que par les cellules NK du sang périphérique d'adultes (Sundstrom et al., 2007) ; ceci nous laisse penser que l'activité cytotoxique médiée par ce récepteur pourrait également être plus importante chez le nouveau-né humain. Un argument indirect en faveur de cette hypothèse est que chez des patients atteints d'hépatite C chronique, les cellules NK présentent une expression réduite des récepteurs NCR en particulier NKp46 par rapport aux cellules NK de personnes saines et que cette diminution d'expression est corrélée à une plus faible lyse médiée par NKp46 (Nattermann et al., 2006).

Le fait que les cellules NK de nouveau-nés soient capables de mieux répondre après une stimulation en présence d'IL-15 plutôt qu'en présence d'IL-2 peut s'expliquer également par la nature des cellules produisant ces deux cytokines. En effet, l'IL-15 est produite par des cellules de l'immunité innée telles que les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages activés, alors que l'IL-2 est produite par les lymphocytes T activés. Chez le nouveau-né, chez lequel le système immunitaire adaptatif est encore en développement, l'environnement cytokinique serait pauvre en IL-2 et lors d'une réponse immunitaire primaire de l'animal naïf, les cellules NK seraient préférentiellement stimulables avec l'IL-15 ce qui pourrait être lié au fait qu'elles sont mieux équipées pour répondre à la stimulation par cette cytokine.

D'autres cytokines, telles que l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-21 sont également impliquées dans l'activation des cellules NK. L'IL-12, produite notamment par les cellules dendritiques activées, permet d'induire la production d'IFN- γ par les cellules NK (articles 1 et 2). Chez l'Homme et la souris, il a été montré que l'IL-18, également produite par les cellules dendritiques, et l'IL-21, produite par les lymphocytes T activés, agissent en synergie avec les autres cytokines pour augmenter l'activité des cellules NK (Chaix et al., 2008; de Rham et al., 2007; Pintaric et al., 2008). Il serait intéressant de tester la réactivité des cellules NK de ruminants (nouveau-nés et adultes) à ces cytokines.

II- Définitions et fonctions alternatives des cellules NK

1- Les cellules NK d'une espèce donnée peuvent-elles toutes être définies par un seul marqueur ?

Bien que le récepteur NKp46 soit aujourd'hui considéré comme étant spécifique des cellules NK de toutes les espèces animales (Walzer et al., 2007b), il semblerait qu'il ne soit pas exprimé par toutes les cellules NK de l'organisme et que la répartition des cellules NK exprimant ce marqueur diffère en fonction des espèces.

En effet, chez l'Homme, dans le sang périphérique, les cellules NK expriment NKp46 (Moretta et al., 2001a) mais des cellules NK n'exprimant pas NKp46 ont été identifiées dans des ganglions lymphatiques (Fehniger et al., 2003; Ferlazzo et al., 2004).

Chez la souris, les cellules NK étaient définies comme étant NK1.1⁺/CD3⁻; cependant l'existence de lignées murines ayant des cellules NK n'exprimant pas NK1.1 suggérait que chez la souris toutes les cellules NK n'expriment pas ce marqueur (Carlyle et al., 2006). Par la suite, le récepteur NKp46 a été considéré comme spécifique des cellules NK dans cette espèce puisqu'il est exprimé par toutes les cellules NK (NK1.1⁺ et NK1.1⁻) des ganglions lymphatiques, de la rate, des poumons, du foie et du sang périphérique (Walzer et al., 2007a).

Chez le porc, les cellules NK jusqu'alors définies en tant que cellules CD8 α ⁺/CD3⁻, ont récemment été mieux caractérisées via la production d'un anticorps anti-NKp46 (Bolzer, K.

Communication affichée, congrès EVIW, 2009). Chez cette espèce, les auteurs ont constaté que parmi les cellules $CD8\alpha^+/CD3^-$ du sang périphérique, le pourcentage de cellules $NKp46^+$ varie considérablement entre les individus ; ils en ont conclu que chez le porc, le récepteur $NKp46$ ne serait pas exprimé par toutes les cellules NK. Néanmoins, les fonctions effectrices des cellules $CD3^-/CD8\alpha^+/NKp46^-$ n'ont pas été analysées.

Chez les bovins, avant que l'anticorps anti- $NKp46$ ait été produit, les populations de cellules NK étaient définies par l'absence d'expression du marqueur $CD3$ associée à l'expression des marqueurs $CD2$ et/ou $CD8$ (Goff et al., 2003; Hope et al., 2002; Koo et al., 2004; Sordillo et al., 2005). Par la suite, le marqueur $NKp46$ a permis de définir les cellules NK bovines et l'existence de cellules NK, $NKp46^+/CD8^-$ (environ 80% des cellules NK du sang périphérique) et $NKp46^+/CD2^-$ (environ 20% des cellules NK du sang périphérique) a été montrée (Boysen et al., 2006b; Storset et al., 2004). Récemment, une étude a décrit, dans le sang périphérique des bovins, l'existence d'une population de cellules NK ($CD2^+/CD3^-$) n'exprimant pas le récepteur $NKp46$ (Graham et al., 2009). Néanmoins, bien que la majorité des cellules $CD2^+/CD3^-$ qui expriment la perforine soient $NKp46^-$ chez l'adulte, leurs fonctions effectrices (cytotoxicité naturelle et production d' $IFN-\gamma$) n'ont pas été analysées.

Nous pouvons constater que chez toutes les espèces animales, avant la découverte du marqueur $NKp46$, les cellules NK étaient définies à la fois sur des critères phénotypiques, comme étant des cellules non-T, non-B et en particulier n'exprimant pas le marqueur $CD3$ mais également via leurs propriétés fonctionnelles. Dans notre étude sur les cellules NK ovines (article 2), nous n'avons pas pu utiliser le marqueur $CD3$ pour montrer qu'elles étaient $CD3^-$, car à ce jour aucun anticorps n'est disponible pour cette espèce animale. Nous avons testé un anticorps polyclonal anti- $CD3$ humain (Dako ; #A0452) disponible au laboratoire et avons constaté qu'il marque les lymphocytes ovins en immunohistochimie mais ne fonctionne pas en cytométrie en flux. Nous nous sommes assurés que la population cellulaire $CD16^+/CD14^-$ ne représente pas une population lymphocytaire autre que les cellules NK, en particulier par marquage avec des anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques des autres populations lymphocytaires ($CD5$ pour les lymphocytes T, B-B4 pour lymphocytes B et TcR1-N7 pour les lymphocytes T- $\gamma\delta$). Néanmoins, il est important de souligner que la population cellulaire $CD16^+/CD14^-$ renferme la vaste majorité, mais vraisemblablement pas toutes les cellules NK du sang. En analysant l'expression de la perforine dans les différentes

populations cellulaires issues du marquage avec les anticorps anti-CD16 et anti-CD14 nous avons constaté que les cellules CD16⁺/CD14⁻ mais aussi un très faible pourcentage de cellules CD16⁻/CD14⁻ exprimaient la perforine. Les cellules CD16⁻/CD14⁻ pourraient correspondre à des lymphocytes T CD8⁺ (comme nous l'avons évoqué dans la partie discussion de l'article 2) mais il est également possible qu'une partie de ces cellules corresponde à un sous-ensemble de cellules NK n'exprimant pas le récepteur CD16 ; chez l'Homme il existe une population de cellules NK CD56^{bright}/CD16⁻ présentes en minorité dans le sang périphérique (Cooper et al., 2001). De plus, chez les bovins, 94% des cellules NKp46⁺ du sang périphérique expriment le marqueur CD16, donc 6% des cellules sont CD16⁻ (Boysen et al., 2008).

2- La fixation d'anticorps à des récepteurs activateurs induit-elle toujours une activation des cellules NK ?

Nous avons montré que l'anticorps anti-NKp46 adsorbé à la surface d'un puits de culture ou fixé à des cellules cibles (au niveau de sa portion Fc), induit l'activation du récepteur exprimé à la surface des cellules NK corrélée à une augmentation de l'activité cytotoxique et de la production d'IFN- γ des cellules NK bovines (article 1). Dans l'article 2, nous avons montré que les cellules NK bovines et les cellules CD16⁺/CD14⁻ ovines présentent une activité cytotoxique lors d'une lyse redirigée médiée par le récepteur CD16. Nous avons noté que pour les cellules NK bovines, l'activité cytotoxique est plus importante suite à l'activation du récepteur NKp46 que du récepteur CD16. Cette différence pourrait être due à une expression du récepteur NKp46 à la surface cellulaire supérieure à celle du récepteur CD16. Une autre explication possible est que le récepteur NKp46, faisant partie de la famille des récepteurs NCR (pour *Natural Cytotoxicity Receptors*), induit un signal d'activation plus intense que le récepteur CD16.

Chez l'Homme, en 1997, Sivori *et al.*, ont montré que les cellules NK fraîchement isolées ou cultivées en présence de cytokines, présentent une activité cytotoxique élevée lors d'une lyse redirigée médiée par NKp46 ou par CD16 (Sivori et al., 1997). En 2006, Bryceson *et al.*, présentent des résultats différents en montrant que les cellules NK fraîchement isolées ne présentent pas d'activité cytotoxique lors d'une lyse redirigée médiée par NKp46, alors que la lyse redirigée médiée par CD16 induit une activité cytotoxique des cellules NK qui augmente avec le rapport effecteur:cible. Cependant, après culture des cellules NK en présence d'IL-2,

la même activité cytotoxique des cellules NK est observée, à la fois lors de l'activation du récepteur CD16 ou du récepteur NKp46 (Bryceson et al., 2006b).

Chez la souris, des cellules NK fraîchement isolées présentent une augmentation de cytotoxicité lors d'un test de lyse lorsque l'anticorps anti-NKp46 a été préalablement adsorbé à la surface des puits (Walzer et al., 2007a). Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules NK de rat préalablement activées avec de l'IL-2 lors d'un test de lyse redirigée médiée par NKp46 (Westgaard et al., 2004).

Chez le porc, la cytotoxicité analysée lors d'un test de lyse médiée par NKp46 sur des PBMC fraîchement prélevés ou préalablement cultivés en présence d'IL-2 a montré une absence de cytotoxicité. En revanche, lors d'une lyse médiée par CD16, les PBMC fraîchement prélevés déploient une activité cytotoxique contrairement aux PBMC préalablement cultivés en présence d'IL-2. (Bolzer, K. Communication affichée, congrès EVIW, 2009). Néanmoins il faudrait réaliser ces tests avec des populations de cellules NK purifiées afin de déterminer la part des cellules NK dans l'activité cytotoxique observée. De plus, comme nous l'avons évoqué précédemment (pages 127-128) le pourcentage de cellules NK exprimant NKp46 chez le porc est très variable d'un individu à l'autre. L'analyse de l'activité cytotoxique de chaque sous populations de cellules NK (NKp46⁺ et NKp46⁻) reste également à déterminer.

Ces différences de réactivité des cellules NK *in vitro*, montrent que les mécanismes d'activation des cellules NK diffèrent entre les espèces mais globalement, il semblerait que pour induire l'activation de leurs fonctions effectrices, il soit important que l'anticorps dirigé contre un récepteur activateur soit associé à une surface (cellulaire ou puits de culture), mimant ainsi la liaison d'un ligand membranaire d'une cellule cible au récepteur. En effet, dans le cas du récepteur NKp46, la lyse de cellules cibles n'exprimant pas le récepteur Fc (FcR⁻) par des cellules NK de bovin (Storset et al., 2004) et de rat (Westgaard et al., 2004) est inhibée en présence d'anticorps anti-NKp46, suggérant que l'anticorps bloque l'interaction entre la cellule NK et un ligand exprimé à la surface de la cellule cible.

III- Perspectives d'études du rôle des cellules NK dans un contexte infectieux

Les résultats présentés dans ce mémoire concernent uniquement les aspects « physiologiques » des cellules NK. Cependant, l'objectif est de poursuivre les études sur la participation des cellules NK lors de la réponse immunitaire anti-infectieuse.

Dans le cadre de la compréhension des particularités de la réponse immunitaire innée du nouveau-né à l'infection, il serait intéressant de comparer la réactivité des cellules NK de nouveau-nés et de veaux plus âgés dans un modèle d'infection de lignées cellulaires bovines. Le parasite protozoaire *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) infecte les cellules épithéliales intestinales de nombreuses espèces. En 2005, Dann *et al.*, ont montré, dans des expériences d'infection de lignées cellulaires intestinales humaines avec *C. parvum*, que les cellules NK humaines stimulées avec de l'IL-15 sont capables de lyser les cellules infectées qui surexpriment des molécules de CMH de classe I non conventionnelles (MicA et MicB), par un mécanisme impliquant NKG2D (Dann *et al.*, 2005). Néanmoins, dans cette étude l'analyse de l'intensité de lyse des cellules cibles non infectées par rapport à celle des cellules infectées n'a pas été faite. Nous avons voulu analyser cet aspect avec les cellules NK bovines. Pour cela, nous avons infecté des lignées cellulaires bovines MDBK (pour *Madin Darby Bovine Kidney*) avec le parasite. Après marquage des cellules avec un anticorps polyclonal anti-*C.parvum*, les cellules ont été analysées au microscope à fluorescence. La **figure 28**, nous montre que la grande majorité des cellules MDBK sont infectées.

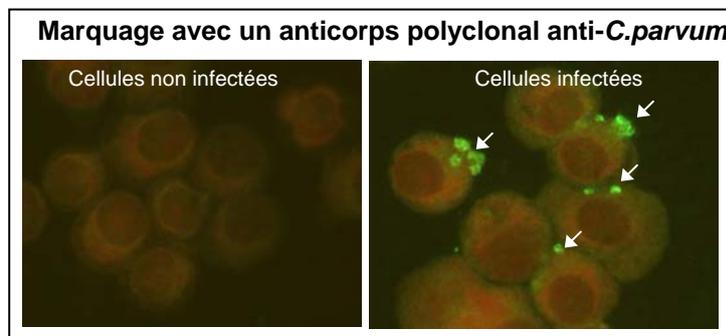


Figure 28. Analyse par immunofluorescence des cellules MDBK infectées *in-vitro* par *C. parvum*.

Lors d'un test de lyse directe, nous avons constaté que les cellules NK d'un animal donné ne lysent pas plus de cellules cibles infectées que de cellules non infectées (**figure 29**). Nous avons pensé que cette absence de différence pouvait être due à un pourcentage de lyse des cellules MDBK non infectées déjà trop élevé, ne permettant donc pas d'observer une augmentation du pourcentage de cellules lysées lorsqu'elles sont infectées.

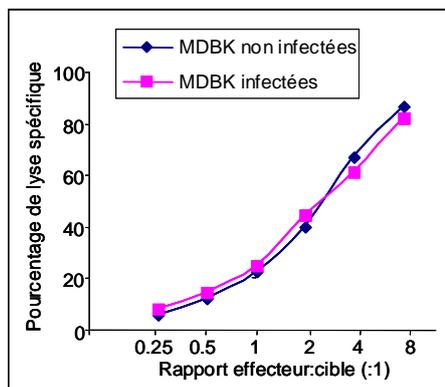


Figure 29. Lyse directe des cellules MDBK infectées par *C. parvum* par les cellules NK d'un même veau

Pour pouvoir observer une différence de cytotoxicité des cellules NK contre les cellules cibles infectées ou non, il faudrait pouvoir disposer de cellules cibles contre lesquelles les cellules NK présentent une faible cytotoxicité spontanée. Nous avons donc recherché des lignées cellulaires bovines plus « résistantes » à la lyse ; nous avons testé la lyse des cellules d'une lignée épithéliale mammaire (MacT) et une lignée épithéliale trachéale (EBRT) et avons constaté que ces deux lignées mises en présence des cellules NK d'un même animal, présentent des pourcentages de lyse un peu plus faibles que les cellules MDBK (**figure 30**).

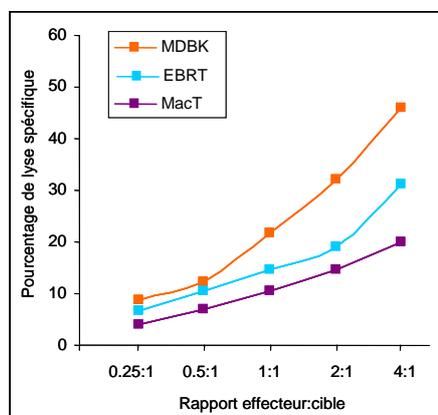


Figure 30. Lyse directe des lignées bovines MDBK, EBRT ou MacT (non infectées), par les cellules NK d'un même veau.

Il serait donc intéressant de tester la capacité des cellules de ces deux lignées à être infectées par le parasite *C. parvum* avant de comparer la réponse des cellules NK de veaux nouveau-nés à celle de veaux plus âgés (production d'IFN- γ et cytotoxicité) contre les cellules cibles infectées.

Il serait également intéressant d'analyser les propriétés des cellules NK issues d'animaux infectés par le parasite. Dans le cas d'une infection par *C. parvum*, il serait logique d'analyser les propriétés fonctionnelles des cellules NK présentes dans la muqueuse intestinale. Pour des raisons économiques et pratiques, cette étude est peu envisageable chez les bovins. C'est pourquoi, ayant maintenant la possibilité d'isoler les cellules NK ovines, le mouton, également sensible à cette infection constitue un bon modèle pour réaliser cette étude.

La stratégie générale consisterait dans un premier temps, sur des coupes histologiques, à déterminer par immunomarquage si l'infection induit un recrutement des cellules NK au niveau de l'intestin. Il serait également intéressant d'extraire les lymphocytes de la muqueuse intestinale d'animaux infectés par le parasite et d'animaux sains en adaptant la méthode mise au point au laboratoire pour le raton et la souris, adaptée de (Cerf-Bensussan et al., 1985). Au laboratoire, des travaux réalisés chez le rat ont montré que les cellules NK de la muqueuse intestinale sont en position sub-épithéliale (Drouet, F. Communication affichée, 20^{ème} Colloque Biotechnocentre, 2007 ; Lemoine, R. Mémoire de Master 2 recherche, 2006). À partir des lymphocytes sub-épithéliaux, les cellules NK seraient triées puis analysées d'une part, par PCR quantitative pour l'expression des gènes codant pour l'IFN- γ et pour des récepteurs activateurs tels que NKp46, d'autre part, par cytométrie en flux pour déterminer le phénotype et l'état d'activation des cellules NK triées. Enfin, il serait intéressant de comparer le degré de cytotoxicité de cellules NK fraîchement triées issues d'animaux infectés et d'animaux sains, contre des cellules cibles ovines.

Références bibliographiques

Articles de périodiques électroniques

- Abrahams, V.M., Straszewski-Chavez, S.L., Guller, S., Mor, G., 2004, First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 10, 55-63.
- Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2007a, Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8, 942-949.
- Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Napolitani, G., 2007b, Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8, 639-646.
- Adkins, B., Leclerc, C., Marshall-Clarke, S., 2004, Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 4, 553-564.
- Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R.I., Lord, G.M., 2007, The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 148, 32-46.
- Ahn, J.S., Hamilton, M.J., Davis, W.C., Park, Y.H., 2002, Cloning of bovine CD69. *Vet Immunol Immunopathol* 88, 43-48.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., Romagnani, S., 2007, Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204, 1849-1861.
- Arase, H., Saito, T., Phillips, J.H., Lanier, L.L., 2001, Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *J Immunol* 167, 1141-1144.
- Aujla, S.J., Kolls, J.K., 2009, IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. *J Mol Med* 87, 451-454.
- Bajenoff, M., Breart, B., Huang, A.Y., Qi, H., Cazareth, J., Braud, V.M., Germain, R.N., Glaichenhaus, N., 2006, Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 203, 619-631.
- Bakker, A.B., Phillips, J.H., Figdor, C.G., Lanier, L.L., 1998, Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL. *J Immunol* 160, 5239-5245.
- Barakat, F.M., McDonald, V., Di Santo, J.P., Korbel, D.S., 2009, Roles for NK cells and an NK cell-independent source of intestinal IFN- γ for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun*.
- Bastos, R.G., Johnson, W.C., Mwangi, W., Brown, W.C., Goff, W.L., 2008, Bovine NK cells acquire cytotoxic activity and produce IFN-gamma after stimulation by *Mycobacterium bovis* BCG- or *Babesia bovis*-exposed splenic dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol*.
- Beadling, C., Slifka, M.K., 2006, Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 54, 15-24.
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., Cabrera, N., Gonzalez, A., Maldonado, C., Isibasi, A., 2003, Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 130, 65-74.
- Becknell, B., Caligiuri, M.A., 2005, Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol* 86, 209-239.
- Beetz, S., Wesch, D., Marischen, L., Welte, S., Oberg, H.H., Kabelitz, D., 2008, Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* 213, 173-182.

- Bem, R.A., Bos, A.P., Bots, M., Wolbink, A.M., van Ham, S.M., Medema, J.P., Lutter, R., van Woensel, J.B., 2008, Activation of the granzyme pathway in children with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res* 63, 650-655.
- Bernstein, H.B., Kinter, A.L., Jackson, R., Fauci, A.S., 2004, Neonatal natural killer cells produce chemokines and suppress HIV replication in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20, 1189-1195.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006, Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Biassoni, R., Pessino, A., Bottino, C., Pende, D., Moretta, L., Moretta, A., 1999, The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* 29, 1014-1020.
- Biron, C.A., Brossay, L., 2001, NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* 13, 458-464.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P., 1999, Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17, 189-220.
- Blasius, A.L., Barchet, W., Cella, M., Colonna, M., 2007, Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells. *J Exp Med* 204, 2561-2568.
- Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L., Moretta, A., 2005, Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol* 26, 221-226.
- Bottino, C., Moretta, L., Pende, D., Vitale, M., Moretta, A., 2004, Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. *Mol Immunol* 41, 569-575.
- Boysen, P., Gunnes, G., Pende, D., Valheim, M., Storset, A.K., 2008, Natural killer cells in lymph nodes of healthy calves express CD16 and show both cytotoxic and cytokine-producing properties. *Dev Comp Immunol* 32, 773-783.
- Boysen, P., Klevar, S., Olsen, I., Storset, A.K., 2006a, The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. *Infect Immun* 74, 953-960.
- Boysen, P., Olsen, I., Berg, I., Kulberg, S., Johansen, G.M., Storset, A.K., 2006b, Bovine CD2-/NKp46+ cells are fully functional natural killer cells with a high activation status. *BMC Immunol* 7, 10.
- Boysen, P., Storset, A.K., 2009, Bovine natural killer cells. *Vet Immunol Immunopathol*.
- Brady, J., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Nutt, S.L., 2004, IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* 172, 2048-2058.
- Brown, M.G., Fulmek, S., Matsumoto, K., Cho, R., Lyons, P.A., Levy, E.R., Scalzo, A.A., Yokoyama, W.M., 1997, A 2-Mb YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6. *Genomics* 42, 16-25.
- Brunda, M.J., 1994, Interleukin-12. *J Leukoc Biol* 55, 280-288.
- Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., Long, E.O., 2006a, Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214, 73-91.
- Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., Long, E.O., 2006b, Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159-166.
- Calado, R.T., Garcia, A.B., Falcao, R.P., 1999, Age-related changes of immunophenotypically immature lymphocytes in normal human peripheral blood. *Cytometry* 38, 133-137.

- Caminschi, I., Ahmet, F., Heger, K., Brady, J., Nutt, S.L., Vremec, D., Pietersz, S., Lahoud, M.H., Schofield, L., Hansen, D.S., O'Keefe, M., Smyth, M.J., Bedoui, S., Davey, G.M., Villadangos, J.A., Heath, W.R., Shortman, K., 2007, Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells. *J Exp Med* 204, 2579-2590.
- Canavez, F., Young, N.T., Guethlein, L.A., Rajalingam, R., Khakoo, S.I., Shum, B.P., Parham, P., 2001, Comparison of chimpanzee and human leukocyte Ig-like receptor genes reveals framework and rapidly evolving genes. *J Immunol* 167, 5786-5794.
- Carlyle, J.R., Mesci, A., Ljutic, B., Belanger, S., Tai, L.H., Rousselle, E., Troke, A.D., Proteau, M.F., Makrigiannis, A.P., 2006, Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1 alloreactivity of mouse NK cells. *J Immunol* 176, 7511-7524.
- Carson, W.E., Fehniger, T.A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M.J., Lai, C.F., Croce, C.M., Baumann, H., Caligiuri, M.A., 1997, A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* 99, 937-943.
- Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., Caligiuri, M.A., 1994, Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180, 1395-1403.
- Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K., Doherty, J.M., Mills, J.C., Colonna, M., 2009, A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457, 722-725.
- Cerf-Bensussan, N., Guy-Grand, D., Griscelli, C., 1985, Intraepithelial lymphocytes of human gut: isolation, characterisation and study of natural killer activity. *Gut* 26, 81-88.
- Chaix, J., Tessmer, M.S., Hoebe, K., Fuseri, N., Ryffel, B., Dalod, M., Alexopoulou, L., Beutler, B., Brossay, L., Vivier, E., Walzer, T., 2008, Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol* 181, 1627-1631.
- Chalifour, A., Jeannin, P., Gauchat, J.F., Blaecke, A., Malissard, M., N'Guyen, T., Thieblemont, N., Delneste, Y., 2004, Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104, 1778-1783.
- Chan, C.W., Crafton, E., Fan, H.N., Flook, J., Yoshimura, K., Skarica, M., Brockstedt, D., Dubensky, T.W., Stins, M.F., Lanier, L.L., Pardoll, D.M., Housseau, F., 2006, Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 12, 207-213.
- Chelvarajan, L., Popa, D., Liu, Y., Getchell, T.V., Stromberg, A.J., Bondada, S., 2007, Molecular mechanisms underlying anti-inflammatory phenotype of neonatal splenic macrophages. *J Leukoc Biol* 82, 403-416.
- Chen, S., Kawashima, H., Lowe, J.B., Lanier, L.L., Fukuda, M., 2005, Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. *J Exp Med* 202, 1679-1689.
- Chen, Y.H., Chiu, N.M., Mandal, M., Wang, N., Wang, C.R., 1997, Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 6, 459-467.
- Chlewicki, L.K., Velikovskiy, C.A., Balakrishnan, V., Mariuzza, R.A., Kumar, V., 2008, Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244). *J Immunol* 180, 8159-8167.
- Choi, S.S., Chhabra, V.S., Nguyen, Q.H., Ank, B.J., Stiehm, E.R., Roberts, R.L., 2004, Interleukin-15 enhances cytotoxicity, receptor expression, and expansion of neonatal natural killer cells in long-term culture. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 879-888.
- Colonna, M., 2009, Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity* 1, 15-23.

- Colucci, F., Caligiuri, M.A., Di Santo, J.P., 2003, What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 3, 413-425.
- Comans-Bitter, W.M., de Groot, R., van den Beemd, R., Neijens, H.J., Hop, W.C., Groeneveld, K., Hooijkaas, H., van Dongen, J.J., 1997, Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 130, 388-393.
- Cooper, M.A., Elliott, J.M., Keyel, P.A., Yang, L., Carrero, J.A., Yokoyama, W.M., 2009, Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1915-1919.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., 2001, The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633-640.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Fuchs, A., Colonna, M., Caligiuri, M.A., 2004, NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 25, 47-52.
- Curtis, M.M., Way, S.S., Wilson, C.B., 2009, IL-23 promotes the production of IL-17 by antigen-specific CD8 T cells in the absence of IL-12 and type-I interferons. *J Immunol* 183, 381-387.
- Dann, S.M., Wang, H.C., Gambarin, K.J., Actor, J.K., Robinson, P., Lewis, D.E., Caillat-Zucman, S., White, A.C., Jr., 2005, Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan cryptosporidium. *J Infect Dis* 192, 1294-1302.
- Davis, I.D., Skak, K., Smyth, M.J., Kristjansen, P.E., Miller, D.M., Sivakumar, P.V., 2007, Interleukin-21 signaling: functions in cancer and autoimmunity. *Clin Cancer Res* 13, 6926-6932.
- De Maria, A., Biassoni, R., Fogli, M., Rizzi, M., Cantoni, C., Costa, P., Conte, R., Mavilio, D., Ensoli, B., Cafaro, A., Moretta, A., Moretta, L., 2001, Identification, molecular cloning and functional characterization of NKp46 and NKp30 natural cytotoxicity receptors in *Macaca fascicularis* NK cells. *Eur J Immunol* 31, 3546-3556.
- de Rham, C., Ferrari-Lacraz, S., Jendly, S., Schneiter, G., Dayer, J.M., Villard, J., 2007, The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res Ther* 9, R125.
- de Vries, E., de Bruin-Versteeg, S., Comans-Bitter, W.M., de Groot, R., Hop, W.C., Boerma, G.J., Lotgering, F.K., Sauer, P.J., van Dongen, J.J., 2000, Neonatal blood lymphocyte subpopulations: a different perspective when using absolute counts. *Biol Neonate* 77, 230-235.
- Degli-Esposti, M.A., Smyth, M.J., 2005, Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 5, 112-124.
- Della Chiesa, M., Sivori, S., Castriconi, R., Marcenaro, E., Moretta, A., 2005, Pathogen-induced private conversations between natural killer and dendritic cells. *Trends Microbiol* 13, 128-136.
- Di Santo, J.P., 2008, Functionally distinct NK-cell subsets: developmental origins and biological implications. *Eur J Immunol* 38, 2948-2951.
- Dinarello, C.A., 1999, Interleukin-18. *Methods* 19, 121-132.
- El Costa, H., Tabiasco, J., Berrebi, A., Parant, O., Aguerre-Girr, M., Piccinni, M.P., Le Bouteiller, P., 2009, Effector functions of human decidual NK cells in healthy early pregnancy are dependent on the specific engagement of natural cytotoxicity receptors. *J Reprod Immunol*.
- Elhmouzi-Younes, J., Boysen, P., Pende, D., Storset, A.K., Le Vern, Y., Laurent, F., Drouet, F., 2009a, Ovine CD16⁺/CD14⁻ blood lymphocytes present all the major characteristics of Natural Killer cells. *Vet Res* 41, 4.

- Elh mouzi-Younes, J., Storset, A.K., Boysen, P., Laurent, F., Drouet, F., 2009b, Bovine neonate Natural Killer cells are fully functional and highly responsive to interleukin-15 and to NKp46 receptor stimulation. *Vet Res* 40, 54.
- Endsley, J.J., Endsley, M.A., Estes, D.M., 2006, Bovine natural killer cells acquire cytotoxic/effector activity following activation with IL-12/15 and reduce *Mycobacterium bovis* BCG in infected macrophages. *J Leukoc Biol* 79, 71-79.
- Endsley, J.J., Furrer, J.L., Endsley, M.A., McIntosh, M.A., Maue, A.C., Waters, W.R., Lee, D.R., Estes, D.M., 2004, Characterization of bovine homologues of granulysin and NK-lysin. *J Immunol* 173, 2607-2614.
- Erkeller-Yuksel, F.M., Deneys, V., Yuksel, B., Hannel, I., Hulstaert, F., Hamilton, C., Mackinnon, H., Stokes, L.T., Munhyeshuli, V., Vanlangendonck, F., et al., 1992, Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 120, 216-222.
- Evans, D.L., Jaso-Friedmann, L., 1993, Natural killer (NK) cells in domestic animals: phenotype, target cell specificity and cytokine regulation. *Vet Res Commun* 17, 429-447.
- Falco, M., Cantoni, C., Bottino, C., Moretta, A., Biassoni, R., 1999, Identification of the rat homologue of the human NKp46 triggering receptor. *Immunol Lett* 68, 411-414.
- Fan, Y.Y., Yang, B.Y., Wu, C.Y., 2008, Phenotypic and functional heterogeneity of natural killer cells from umbilical cord blood mononuclear cells. *Immunol Invest* 37, 79-96.
- Farag, S.S., Caligiuri, M.A., 2006, Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 20, 123-137.
- Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Caligiuri, M.A., 2002, Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 169-183.
- Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., Caligiuri, M.A., 2003, CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101, 3052-3057.
- Fehniger, T.A., Yu, H., Cooper, M.A., Suzuki, K., Shah, M.H., Caligiuri, M.A., 2000, Cutting edge: IL-15 costimulates the generalized Shwartzman reaction and innate immune IFN-gamma production in vivo. *J Immunol* 164, 1643-1647.
- Fenneteau, O., Hurtaud-Roux, M.F., Schlegel, N., 2006, [Normal and abnormal cytological aspects of peripheral blood cells in neonates and young children]. *Ann Biol Clin (Paris)* 64, 17-36.
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A., Munz, C., 2004, The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 172, 1455-1462.
- Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., Munz, C., 2002, Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195, 343-351.
- Freud, A.G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H.C., Ferketich, A.K., Nuovo, G.J., Hughes, T.L., Marburger, T.B., Sung, J., Baiocchi, R.A., Guimond, M., Caligiuri, M.A., 2005, A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 22, 295-304.
- Gaddy, J., Broxmeyer, H.E., 1997, Cord blood CD16+56- cells with low lytic activity are possible precursors of mature natural killer cells. *Cell Immunol* 180, 132-142.
- Gapin, L., Matsuda, J.L., Surh, C.D., Kronenberg, M., 2001, NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2, 971-978.
- Gasparoni, A., Ciardelli, L., Avanzini, A., Castellazzi, A.M., Carini, R., Rondini, G., Chirico, G., 2003, Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production,

- immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biol Neonate* 84, 297-303.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., Raulet, D.H., 2005, The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186-1190.
- Gazit, R., Garty, B.Z., Monselise, Y., Hoffer, V., Finkelstein, Y., Markel, G., Katz, G., Hanna, J., Achdout, H., Gruda, R., Gonen-Gross, T., Mandelboim, O., 2004, Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. *Blood* 103, 1965-1966.
- Gerner, W., Kaser, T., Saalmuller, A., 2009, Porcine T lymphocytes and NK cells--an update. *Dev Comp Immunol* 33, 310-320.
- Giorda, R., Rudert, W.A., Vavassori, C., Chambers, W.H., Hiserodt, J.C., Trucco, M., 1990, NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science* 249, 1298-1300.
- Gobel, T.W., Chen, C.L., Shrimpf, J., Grossi, C.E., Bernot, A., Bucy, R.P., Auffray, C., Cooper, M.D., 1994, Characterization of avian natural killer cells and their intracellular CD3 protein complex. *Eur J Immunol* 24, 1685-1691.
- Godfrey, W.R., Spoden, D.J., Ge, Y.G., Baker, S.R., Liu, B., Levine, B.L., June, C.H., Blazar, B.R., Porter, S.B., 2005, Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 105, 750-758.
- Goff, W.L., Johnson, W.C., Horn, R.H., Barrington, G.M., Knowles, D.P., 2003, The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunol* 25, 185-188.
- Goff, W.L., Storset, A.K., Johnson, W.C., Brown, W.C., 2006, Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. *Parasite Immunol* 28, 221-228.
- Goriely, S., Vincart, B., Stordeur, P., Vekemans, J., Willems, F., Goldman, M., De Wit, D., 2001, Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J Immunol* 166, 2141-2146.
- Gorski, K.S., Waller, E.L., Bjornton-Severson, J., Hanten, J.A., Riter, C.L., Kieper, W.C., Gorden, K.B., Miller, J.S., Vasilakos, J.P., Tomai, M.A., Alkan, S.S., 2006, Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists. *Int Immunol* 18, 1115-1126.
- Gosselin, J., Tomoiu, A., Gallo, R.C., Flamand, L., 1999, Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood* 94, 4210-4219.
- Govaerts, M.M., Goddeeris, B.M., 2001, Homologues of natural killer cell receptors NKG2-D and NKR-P1 expressed in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 80, 339-344.
- Graham, E.M., Thom, M.L., Howard, C.J., Boysen, P., Storset, A.K., Sopp, P., Hope, J.C., 2009, Natural killer cell number and phenotype in bovine peripheral blood is influenced by age. *Vet Immunol Immunopathol*.
- Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., Walzer, T., 2007, The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220, 169-182.
- Guller, S., LaChapelle, L., 1999, The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces. *Semin Reprod Endocrinol* 17, 39-44.
- Han, P., McDonald, T., Hodge, G., 2004, Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway. *Immunology* 113, 26-34.
- Hannet, I., Erkeller-Yuksel, F., Lydyard, P., Deneys, V., DeBruyere, M., 1992, Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today* 13, 215, 218.

- Hariharan, M.J., Nataraj, C., Srikumaran, S., 1993, Down regulation of murine MHC class I expression by bovine herpesvirus 1. *Viral Immunol* 6, 273-284.
- Hart, O.M., Athie-Morales, V., O'Connor, G.M., Gardiner, C.M., 2005, TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 175, 1636-1642.
- Hayakawa, Y., Screpanti, V., Yagita, H., Grandien, A., Ljunggren, H.G., Smyth, M.J., Chambers, B.J., 2004, NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol* 172, 123-129.
- Hecht, M.L., Rosental, B., Horlacher, T., Hershkovitz, O., De Paz, J.L., Noti, C., Schauer, S., Porgador, A., Seeberger, P.H., 2009, Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J Proteome Res* 8, 712-720.
- Hercend, T., Schmidt, R.E., 1988, Characteristics and uses of natural killer cells. *Immunol Today* 9, 291-293.
- Hermann, E., Alonso-Vega, C., Berthe, A., Truyens, C., Flores, A., Cordova, M., Moretta, L., Torrico, F., Braud, V., Carlier, Y., 2006, Human congenital infection with *Trypanosoma cruzi* induces phenotypic and functional modifications of cord blood NK cells. *Pediatr Res* 60, 38-43.
- Hirose, K., Nishimura, H., Matsuguchi, T., Yoshikai, Y., 1999, Endogenous IL-15 might be responsible for early protection by natural killer cells against infection with an avirulent strain of *Salmonella choleraesuis* in mice. *J Leukoc Biol* 66, 382-390.
- Hoelsbrekken, S.E., Nylenna, O., Saether, P.C., Slettedal, I.O., Ryan, J.C., Fossum, S., Dissen, E., 2003, Cutting edge: molecular cloning of a killer cell Ig-like receptor in the mouse and rat. *J Immunol* 170, 2259-2263.
- Hokland, M., Kuppen, P.J., 2005, Natural killer cells: from "disturbing" background to central players of immune responses. *Mol Immunol* 42, 381-383.
- Hope, J.C., Sopp, P., Howard, C.J., 2002, NK-like CD8(+) cells in immunologically naive neonatal calves that respond to dendritic cells infected with *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol* 71, 184-194.
- Hosea Blewett, H.J., Cicalo, M.C., Holland, C.D., Field, C.J., 2008, The immunological components of human milk. *Adv Food Nutr Res* 54, 45-80.
- Hoshina, T., Kida, K., Ito, M., 1999, Difference in response of NK cell activity in newborns and adult to IL-2, IL-12 and IL-15. *Microbiol Immunol* 43, 161-166.
- Huntington, N.D., Voshenrich, C.A., Di Santo, J.P., 2007, Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* 7, 703-714.
- Hviid, L., Akanmori, B.D., Loizon, S., Kurtzhals, J.A., Ricke, C.H., Lim, A., Koram, K.A., Nkrumah, F.K., Mercereau-Puijalon, O., Behr, C., 2000, High frequency of circulating gamma delta T cells with dominance of the v(delta)1 subset in a healthy population. *Int Immunol* 12, 797-805.
- Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Takemoto, N., Gordon, S.M., Dejong, C.S., Shin, H., Hunter, C.A., Wherry, E.J., Lindsten, T., Reiner, S.L., 2008, Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* 321, 408-411.
- Janeway, C.A., Jr., 2001, How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3, 1167-1171.
- Jentsch-Ullrich, K., Koenigsmann, M., Mohren, M., Franke, A., 2005, Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. *Clin Immunol* 116, 192-197.

- Johnsen, A.C., Haux, J., Steinkjer, B., Nonstad, U., Egeberg, K., Sundan, A., Ashkenazi, A., Espevik, T., 1999, Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine* 11, 664-672.
- Jonges, L.E., Albertsson, P., van Vlierberghe, R.L., Ensink, N.G., Johansson, B.R., van de Velde, C.J., Fleuren, G.J., Nannmark, U., Kuppen, P.J., 2001, The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood. *Scand J Immunol* 53, 103-110.
- Kampen, A.H., Olsen, I., Tollersrud, T., Storset, A.K., Lund, A., 2006, Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Vet Immunol Immunopathol* 113, 53-63.
- Karre, K., 2002, NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55, 221-228.
- Karre, K., 2008, Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol* 9, 477-480.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R., 1986, Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678.
- Katsanos, G.S., Anogeianaki, A., Orso, C., Tete, S., Salini, V., Antinolfi, P.L., Sabatino, G., 2008, Mast cells and chemokines. *J Biol Regul Homeost Agents* 22, 145-151.
- Keskin, D.B., Allan, D.S., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Stern, J.N., Kopcow, H.D., Koopman, L.A., Strominger, J.L., 2007, TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3378-3383.
- Khan, I.A., Thomas, S.Y., Moretto, M.M., Lee, F.S., Islam, S.A., Combe, C., Schwartzman, J.D., Luster, A.D., 2006, CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog* 2, e49.
- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H.L., Weissman, I.L., Yokoyama, W.M., 2000, In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2731-2736.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., Yokoyama, W.M., 2005, Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436, 709-713.
- Kirwan, S.E., Burshtyn, D.N., 2007, Regulation of natural killer cell activity. *Curr Opin Immunol* 19, 46-54.
- Klevar, S., Kulberg, S., Boysen, P., Storset, A.K., Moldal, T., Bjorkman, C., Olsen, I., 2007, Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. *Int J Parasitol* 37, 329-339.
- Kohl, S., 1999, Human neonatal natural killer cell cytotoxicity function. *Pediatr Infect Dis J* 18, 635-637.
- Kohler, G., Milstein, C., 1975, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Koo, H.C., Park, Y.H., Hamilton, M.J., Barrington, G.M., Davies, C.J., Kim, J.B., Dahl, J.L., Waters, W.R., Davis, W.C., 2004, Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected calves. *Infect Immun* 72, 6870-6883.
- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M., Colonna, M., 2004, TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107-119.

- Ku, C.C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J., Marrack, P., 2000, Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288, 675-678.
- Kulberg, S., Boysen, P., Storset, A.K., 2004, Reference values for relative numbers of natural killer cells in cattle blood. *Dev Comp Immunol* 28, 941-948.
- Lacroix-Lamande, S., Mancassola, R., Naciri, M., Laurent, F., 2002, Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 70, 2090-2099.
- Lanier, L.L., 1998, Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv Exp Med Biol* 452, 13-18.
- Lanier, L.L., 2005, NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23, 225-274.
- Lanier, L.L., Phillips, J.H., Hackett, J., Jr., Tutt, M., Kumar, V., 1986, Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 137, 2735-2739.
- Lauzon, N.M., Mian, F., MacKenzie, R., Ashkar, A.A., 2006, The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* 241, 102-112.
- Le-Barillec, K., Magalhaes, J.G., Corcuff, E., Thuizat, A., Sansonetti, P.J., Phalipon, A., Di Santo, J.P., 2005, Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*. *J Immunol* 175, 1735-1740.
- Lee, S.M., Suen, Y., Qian, J., Knoppel, E., Cairo, M.S., 1998, The regulation and biological activity of interleukin 12. *Leuk Lymphoma* 29, 427-438.
- Levy, O., 2007, Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 7, 379-390.
- Lin, S.J., Cheng, P.J., Huang, Y.J., Kuo, M.L., 2004, Evaluation of cytotoxic function and apoptosis in interleukin (IL)-12/IL-15-treated umbilical cord or adult peripheral blood natural killer cells by a propidium-iodide based flow cytometry. *Pediatr Allergy Immunol* 15, 79-85.
- Lin, S.J., Yang, M.H., Chao, H.C., Kuo, M.L., Huang, J.L., 2000, Effect of interleukin-15 and Flt3-ligand on natural killer cell expansion and activation: umbilical cord vs. adult peripheral blood mononuclear cells. *Pediatr Allergy Immunol* 11, 168-174.
- Liu, W.J., Hansen, P.J., 1993, Effect of the progesterone-induced serpin-like proteins of the sheep endometrium on natural-killer cell activity in sheep and mice. *Biol Reprod* 49, 1008-1014.
- Ljunggren, H.G., Karre, K., 1985, Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 162, 1745-1759.
- Lodoen, M.B., Lanier, L.L., 2005, Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol* 3, 59-69.
- Loringh van Beeck, F.A., Reinink, P., Hermsen, R., Zajonc, D.M., Laven, M.J., Fun, A., Troskie, M., Schoemaker, N.J., Morar, D., Lenstra, J.A., Vervelde, L., Rutten, V.P., van Eden, W., Van Rhijn, I., 2009, Functional CD1d and/or NKT cell invariant chain transcript in horse, pig, African elephant and guinea pig, but not in ruminants. *Mol Immunol* 46, 1424-1431.
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., Diefenbach, A., 2007, Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26, 503-517.
- Lundberg, P., Splitter, G.A., 2000, gammadelta(+) T-Lp6phocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus infection in the natural host. *J Virol* 74, 8299-8306.
- Manaster, I., Mandelboim, O., 2008, The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta* 29 Suppl A, S60-66.

- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., Weaver, C.T., 2006, Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J.M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T.A., Tagaya, Y., 2000, IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11445-11450.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., 2008, Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13, 453-461.
- Mathew, S.O., Rao, K.K., Kim, J.R., Bambard, N.D., Mathew, P.A., 2009, Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms. *Eur J Immunol* 39, 1632-1641.
- Matsuura-Sawada, R., Murakami, T., Ozawa, Y., Nabeshima, H., Akahira, J., Sato, Y., Koyanagi, Y., Ito, M., Terada, Y., Okamura, K., 2005, Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice. *Hum Reprod* 20, 1477-1484.
- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M.A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., Fauci, A.S., 2005, Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2886-2891.
- McDonald, V., 2000, Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunol* 22, 597-604.
- McNerney, M.E., Kumar, V., 2006, The CD2 family of natural killer cell receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 298, 91-120.
- McQueen, K.L., Wilhelm, B.T., Harden, K.D., Mager, D.L., 2002, Evolution of NK receptors: a single Ly49 and multiple KIR genes in the cow. *Eur J Immunol* 32, 810-817.
- Medvedev, A.E., Johnsen, A.C., Haux, J., Steinkjer, B., Egeberg, K., Lynch, D.H., Sundan, A., Espevik, T., 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* 9, 394-404.
- Michaelsson, J., Mold, J.E., McCune, J.M., Nixon, D.F., 2006, Regulation of T cell responses in the developing human fetus. *J Immunol* 176, 5741-5748.
- Miller, J.S., McCullar, V., 2001, Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 98, 705-713.
- Moldovan, I., Galon, J., Maridonneau-Parini, I., Roman Roman, S., Mathiot, C., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., 1999, Regulation of production of soluble Fc gamma receptors type III in normal and pathological conditions. *Immunol Lett* 68, 125-134.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, L., 2001a, Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19, 197-223.
- Moretta, A., Tambussi, G., Ciccone, E., Pende, D., Melioli, G., Moretta, L., 1989, CD16 surface molecules regulate the cytolytic function of CD3CD16+ human natural killer cells. *Int J Cancer* 44, 727-730.
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C., Moretta, A., 2001b, Immunobiology of human NK cells. *Transplant Proc* 33, 60-61.
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., Mingari, M.C., Moretta, A., 2004, Different checkpoints in human NK-cell activation. *Trends Immunol* 25, 670-676.
- Mortier, E., Woo, T., Advincula, R., Gozalo, S., Ma, A., 2008, IL-15/Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* 205, 1213-1225.

- Nataraj, C., Eidmann, S., Hariharan, M.J., Sur, J.H., Perry, G.A., Srikumaran, S., 1997, Bovine herpesvirus 1 downregulates the expression of bovine MHC class I molecules. *Viral Immunol* 10, 21-34.
- Nattermann, J., Feldmann, G., Ahlenstiel, G., Langhans, B., Sauerbruch, T., Spengler, U., 2006, Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* 55, 869-877.
- Newman, K.C., Riley, E.M., 2007, Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* 7, 279-291.
- Nomura, A., Takada, H., Jin, C.H., Tanaka, T., Ohga, S., Hara, T., 2001, Functional analyses of cord blood natural killer cells and T cells: a distinctive interleukin-18 response. *Exp Hematol* 29, 1169-1176.
- Nutt, S.L., Brady, J., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., 2004, Interleukin 21: a key player in lymphocyte maturation. *Crit Rev Immunol* 24, 239-250.
- O'Connor, G.M., Hart, O.M., Gardiner, C.M., 2006, Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 117, 1-10.
- O'Gorman, M.R., Millard, D.D., Lowder, J.N., Yogev, R., 1998, Lymphocyte subpopulations in healthy 1-3-day-old infants. *Cytometry* 34, 235-241.
- Olsen, I., Boysen, P., Kulberg, S., Hope, J.C., Jungersen, G., Storset, A.K., 2005, Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infect Immun* 73, 5628-5635.
- Ortaldo, J.R., Young, H.A., 2005, Mouse Ly49 NK receptors: balancing activation and inhibition. *Mol Immunol* 42, 445-450.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C., 2005, A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6, 1133-1141.
- Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J.A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., Schrader, S., Burkhead, S., Heipel, M., Brandt, C., Kuijper, J.L., Kramer, J., Conklin, D., Presnell, S.R., Berry, J., Shiota, F., Bort, S., Hambly, K., Mudri, S., Clegg, C., Moore, M., Grant, F.J., Lofton-Day, C., Gilbert, T., Raymond, F., Ching, A., Yao, L., Smith, D., Webster, P., Whitmore, T., Maurer, M., Kaushansky, K., Holly, R.D., Foster, D., 2000, Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57-63.
- Peritt, D., Robertson, S., Gri, G., Showe, L., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G., 1998, Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 161, 5821-5824.
- Pillarisetty, V.G., Katz, S.C., Bleier, J.I., Shah, A.B., Dematteo, R.P., 2005, Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J Immunol* 174, 2612-2618.
- Pintaric, M., Gerner, W., Saalmuller, A., 2008, Synergistic effects of IL-2, IL-12 and IL-18 on cytolytic activity, perforin expression and IFN-gamma production of porcine natural killer cells. *Vet Immunol Immunopathol* 121, 68-82.
- Price, S.J., Sopp, P., Howard, C.J., Hope, J.C., 2007, Workshop cluster 1+ gammadelta T-cell receptor T cells from calves express high levels of interferon-gamma in response to stimulation with interleukin-12 and -18. *Immunology* 120, 57-65.
- Rajalingam, R., 2007, Killer cell immunoglobulin-like receptors influence the innate and adaptive immune responses. *Iran J Immunol* 4, 61-78.
- Ravet, S., Scott-Algara, D., Bonnet, E., Tran, H.K., Tran, T., Nguyen, N., Truong, L.X., Theodorou, I., Barre-Sinoussi, F., Pancino, G., Paul, P., 2007, Distinctive NK-cell

- receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood* 109, 4296-4305.
- Renedo, M., Arce, I., Rodriguez, A., Carretero, M., Lanier, L.L., Lopez-Botet, M., Fernandez-Ruiz, E., 1997, The human natural killer gene complex is located on chromosome 12p12-p13. *Immunogenetics* 46, 307-311.
- Ridge, J.P., Fuchs, E.J., Matzinger, P., 1996, Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 271, 1723-1726.
- Ritz, J., Schmidt, R.E., Michon, J., Hercend, T., Schlossman, S.F., 1988, Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 42, 181-211.
- Romagnani, S., 1991, Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 12, 256-257.
- Romagnani, S., 1997, The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18, 263-266.
- Rubinstein, M.P., Kovar, M., Purton, J.F., Cho, J.H., Boyman, O., Surh, C.D., Sprent, J., 2006, Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9166-9171.
- Saikh, K.U., Lee, J.S., Kissner, T.L., Dyas, B., Ulrich, R.G., 2003, Toll-like receptor and cytokine expression patterns of CD56⁺ T cells are similar to natural killer cells in response to infection with Venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Infect Dis* 188, 1562-1570.
- Sambrook, J.G., Bashirova, A., Palmer, S., Sims, S., Trowsdale, J., Abi-Rached, L., Parham, P., Carrington, M., Beck, S., 2005, Single haplotype analysis demonstrates rapid evolution of the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) loci in primates. *Genome Res* 15, 25-35.
- Satwani, P., Ayello, J., Ven, C., O'Neill, A.F., Simpson, L.L., Baxi, L., Cairo, M.S., 2005a, Immaturity of IL-18 gene expression and protein production in cord blood (CB) versus peripheral blood (PB) mononuclear cells and differential effects in natural killer (NK) cell development and function. *Br J Haematol* 130, 284-292.
- Satwani, P., Morris, E., van de Ven, C., Cairo, M.S., 2005b, Dysregulation of expression of immunoregulatory and cytokine genes and its association with the immaturity in neonatal phagocytic and cellular immunity. *Biol Neonate* 88, 214-227.
- Sawaki, J., Tsutsui, H., Hayashi, N., Yasuda, K., Akira, S., Tanizawa, T., Nakanishi, K., 2007, Type 1 cytokine/chemokine production by mouse NK cells following activation of their TLR/MyD88-mediated pathways. *Int Immunol* 19, 311-320.
- Scharton-Kersten, T.M., Sher, A., 1997, Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 9, 44-51.
- Schmidt, K.N., Leung, B., Kwong, M., Zarembek, K.A., Satyal, S., Navas, T.A., Wang, F., Godowski, P.J., 2004, APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol* 172, 138-143.
- Scott, P., Trinchieri, G., 1995, The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol* 7, 34-40.
- Scott-Algara, D., Arnold, V., Didier, C., Kattan, T., Pirozzi, G., Barre-Sinoussi, F., Pancino, G., 2008, The CD85j⁺ NK cell subset potently controls HIV-1 replication in autologous dendritic cells. *PLoS One* 3, e1975.
- Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., Moretta, A., 2004, CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10116-10121.
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., 1997, p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 186, 1129-1136.

- Smeltz, R.B., Wolf, N.A., Swanborg, R.H., 1999, Inhibition of autoimmune T cell responses in the DA rat by bone marrow-derived NK cells in vitro: implications for autoimmunity. *J Immunol* 163, 1390-1397.
- Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L., Degli-Esposti, M.A., Hayakawa, Y., 2005a, Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42, 501-510.
- Smyth, M.J., Kelly, J.M., Baxter, A.G., Korner, H., Sedgwick, J.D., 1998, An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *J Exp Med* 188, 1611-1619.
- Smyth, M.J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W.M., Hayakawa, Y., 2005b, NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med* 202, 583-588.
- Sola, C., Andre, P., Lemmers, C., Fusari, N., Bonnafous, C., Blery, M., Wagtmann, N.R., Romagne, F., Vivier, E., Ugolini, S., 2009, Genetic and antibody-mediated reprogramming of natural killer cell missing-self recognition in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12879-12884.
- Sordillo, L.M., Kendall, J.T., Corl, C.M., Cross, T.H., 2005, Molecular characterization of a saposin-like protein family member isolated from bovine lymphocytes. *J Dairy Sci* 88, 1378-1390.
- Stebbins, C.C., Watzl, C., Billadeau, D.D., Leibson, P.J., Burshtyn, D.N., Long, E.O., 2003, Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol Cell Biol* 23, 6291-6299.
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., Wheeler, T.T., 2009, Immune components of bovine colostrum and milk. *J Anim Sci* 87, 3-9.
- Stewart, C.A., Walzer, T., Robbins, S.H., Malissen, B., Vivier, E., Prinz, I., 2007, Germ-line and rearranged Tcrd transcription distinguish bona fide NK cells and NK-like gammadelta T cells. *Eur J Immunol* 37, 1442-1452.
- Storset, A.K., Kulberg, S., Berg, I., Boysen, P., Hope, J.C., Dissen, E., 2004, NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *Eur J Immunol* 34, 669-676.
- Storset, A.K., Slettedal, I.O., Williams, J.L., Law, A., Dissen, E., 2003, Natural killer cell receptors in cattle: a bovine killer cell immunoglobulin-like receptor multigene family contains members with divergent signaling motifs. *Eur J Immunol* 33, 980-990.
- Street, S.E., Cretney, E., Smyth, M.J., 2001, Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192-197.
- Sun, J.C., Beilke, J.N., Lanier, L.L., 2009, Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457, 557-561.
- Sundstrom, Y., Nilsson, C., Lilja, G., Karre, K., Troye-Blomberg, M., Berg, L., 2007, The expression of human natural killer cell receptors in early life. *Scand J Immunol* 66, 335-344.
- Szefalusi, Z., 2008, The maturation of the fetal and neonatal immune system. *J Nutr* 138, 1773S-1781S.
- Tabiasco, J., Rabot, M., Aguerre-Girr, M., El Costa, H., Berrebi, A., Parant, O., Laskarin, G., Juretic, K., Bensussan, A., Rukavina, D., Le Bouteiller, P., 2006, Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties -- a review. *Placenta* 27 Suppl A, S34-39.
- Taieb, J., Chaput, N., Menard, C., Apetoh, L., Ullrich, E., Bonmort, M., Pequignot, M., Casares, N., Terme, M., Flament, C., Opolon, P., Lecluse, Y., Metivier, D., Tomasello, E., Vivier, E., Ghiringhelli, F., Martin, F., Klatzmann, D., Poynard, T., Tursz, T., Raposo, G., Yagita, H., Ryffel, B., Kroemer, G., Zitvogel, L., 2006, A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 12, 214-219.

- Tekin, S., Hansen, P.J., 2002, Natural killer-like cells in the sheep: functional characterization and regulation by pregnancy-associated proteins. *Exp Biol Med (Maywood)* 227, 803-811.
- Tekin, S., Hansen, P.J., 2003, Lymphocyte-mediated lysis of sheep chorion: susceptibility of chorionic cells to third-party and maternal cytotoxic lymphocytes and presence of cells in the endometrium exhibiting cytotoxicity toward natural-killer cell targets. *Theriogenology* 59, 787-800.
- Terabe, M., Berzofsky, J.A., 2008, The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* 101, 277-348.
- Thornton, C.A., Upham, J.W., Wikstrom, M.E., Holt, B.J., White, G.P., Sharp, M.J., Sly, P.D., Holt, P.G., 2004, Functional maturation of CD4+CD25+CTLA4+CD45RA+ T regulatory cells in human neonatal T cell responses to environmental antigens/allergens. *J Immunol* 173, 3084-3092.
- Timonen, T., Saksela, E., Ranki, A., Hayry, P., 1979, Fractionation, morphological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell-line targets. *Cell Immunol* 48, 133-148.
- Trapani, J.A., Smyth, M.J., 2002, Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747.
- Trinchieri, G., 1989, Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47, 187-376.
- Tuo, W., Ott, T.L., Bazer, F.W., 1993, Natural killer cell activity of lymphocytes exposed to ovine, type I, trophoblast interferon. *Am J Reprod Immunol* 29, 26-34.
- Ugolini, S., Vivier, E., 2009, Immunology: Natural killer cells remember. *Nature* 457, 544-545.
- Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L., Parham, P., 1997, Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7, 753-763.
- Unanue, E.R., 1997, Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr Opin Immunol* 9, 35-43.
- Valiante, N.M., Uhrberg, M., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K.L., D'Andrea, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Parham, P., 1997, Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7, 739-751.
- Van Kaer, L., 2007, NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 19, 354-364.
- Vankayalapati, R., Garg, A., Porgador, A., Griffith, D.E., Klucar, P., Safi, H., Girard, W.M., Cosman, D., Spies, T., Barnes, P.F., 2005, Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* 175, 4611-4617.
- Velilla, P.A., Rugeles, M.T., Chougnet, C.A., 2006, Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clin Immunol* 121, 251-259.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008, Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503-510.
- Vosshenrich, C.A., Garcia-Ojeda, M.E., Samson-Villeger, S.I., Pasqualetto, V., Enault, L., Richard-Le Goff, O., Corcuff, E., Guy-Grand, D., Rocha, B., Cumano, A., Rogge, L., Ezine, S., Di Santo, J.P., 2006, A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* 7, 1217-1224.
- Waldmann, T.A., 2006, The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 6, 595-601.

- Walzer, T., Blery, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S.H., Jaeger, S., Andre, P., Gauthier, L., Daniel, L., Chemin, K., Morel, Y., Dalod, M., Imbert, J., Pierres, M., Moretta, A., Romagne, F., Vivier, E., 2007a, Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3384-3389.
- Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J., Vivier, E., 2007b, Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Curr Opin Immunol* 19, 365-372.
- Warren, H.S., 2000, Cd56. *J Biol Regul Homeost Agents* 14, 317-321.
- Warren, H.S., Kinnear, B.F., Kastelein, R.L., Lanier, L.L., 1996, Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells. *J Immunol* 156, 3254-3259.
- Watkins, M.L., Semple, P.L., Abel, B., Hanekom, W.A., Kaplan, G., Ress, S.R., 2008, Exposure of cord blood to Mycobacterium bovis BCG induces an innate response but not a T-cell cytokine response. *Clin Vaccine Immunol* 15, 1666-1673.
- Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R., 1993, Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14, 353-356.
- Westgaard, I.H., Berg, S.F., Vaage, J.T., Wang, L.L., Yokoyama, W.M., Dissen, E., Fossum, S., 2004, Rat NKp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with FcepsilonRIgamma and CD3zeta. *J Leukoc Biol* 76, 1200-1206.
- Wing, K., Larsson, P., Sandstrom, K., Lundin, S.B., Suri-Payer, E., Rudin, A., 2005, CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses. *Immunology* 115, 516-525.
- Wolk, K., Sabat, R., 2006, Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 367-380.
- Zhang, C., Zhang, J., Tian, Z., 2006, The regulatory effect of natural killer cells: do "NK-reg cells" exist? *Cell Mol Immunol* 3, 241-254.
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., Ouyang, W., 2008, Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 14, 282-289.

Travaux universitaires

LEMOINE, R. *Cellules impliquées dans la production précoce d'IFN- γ au cours de l'infection par Cryptosporidium parvum : participation des cellules Natural Killer ?* Mémoire de Master 2 Recherche, Université François Rabelais de Tours, 27 Juin 2006, 30 p.

Communications dans un congrès

- BOLZER, K. NKp46 – a comprehensive marker for porcine Natural Killer cells? 3rd *European Veterinary Immunology Workshop (EVIW), Berlin, 10-13 Septembre 2009.*
- DROUET, F. Cellules impliquées dans la production précoce d'IFN- γ au cours de l'infection de l'animal nouveau-né par *Cryptosporidium parvum* : participation des cellules Natural Killer ? 20^{ème} *Colloque Biotechnocentre, Domaine de Seillac, 25-26 Octobre 2007.*
- JANSEN, C. Identification of new populations of chicken natural killer (NK) cells. 3rd *European Veterinary Immunology Workshop (EVIW), Berlin, 10-13 Septembre 2009.*

Annexes

Annexe 1 : Composition des tampons

- ***Tampon de charge réducteur 5X pour 16ml :***
 - 3.2ml glycérol
 - 2ml Tris 0.5M pH 6.8
 - 3.2ml SDS 10%
 - 1.6ml bleu de bromophénol
 - 0.8ml β -mercaptoéthanol
 - H₂O (quantité suffisante pour 16ml)

- ***Gel de concentration (pour 2 mini gels) :***
 - 0.975ml d'acrylamide 40% (BIORAD)
 - 2.5ml de solution 4X tris 1.5M pH8.8 SDS 0.4%
 - 6.5ml H₂O
 - 75 μ l APS 10% (Sigma-Aldrich)
 - 10 μ l Temed (Sigma-Aldrich)

- ***Gel de concentration (pour 1 gel à 12% d'acrylamide) :***
 - 3ml d'acrylamide 40% (BIORAD)
 - 2.5ml de solution 4X tris 1M pH6.8 SDS 0.4%
 - 4.5ml H₂O
 - 75 μ l APS 10% (Sigma-Aldrich)
 - 10 μ l Temed (Sigma-Aldrich)

- ***Tampon de migration 10X (pour 1L) :***
 - 30.27g Tris
 - 144.1g glycine
 - H₂O désionisée (quantité suffisante pour 1L)
 - Régler le pH à 8.27
 - Pour la migration du tampon 1X est préparé et 0.1% de SDS sont rajoutés

- ***Tampon de transfert (pour 250ml) :***
 - 0.73g de glycine
 - 1.45g de Tris
 - 940 μ l de SDS 10X
 - 50ml de méthanol
 - H₂O (quantité suffisante pour 250ml)

- ***Tampon de TNT (pour 500ml) :***
 - 10ml Tris 1M pH7.4
 - 14ml NaCl 5M
 - 250 μ l Tween

Annexe 2 : Conditions de culture des cellules

- Cellules 293S

- *Composition du milieu*

- RPMI 1640 contenant du L-glutamax (Gibco ; #61870)
- 10% SVF (Sigma-Aldrich ; #F7524) décomplémenté 40 minutes à 56°C
- 1% Pénicilline/Streptomycine (Sigma-Aldrich ; #P0781)

- *Conditions de culture*

Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ et sont maintenues en agitation permanente afin d'éviter qu'elles n'adhèrent.

- Cellules Natural Killer bovines

- *Composition du milieu*

- RPMI 1640 contenant du L-glutamax (Gibco ; #61870)
- 10% SVF (Sigma-Aldrich ; #F7524) décomplémenté 40 minutes à 56°C
- 1% sodium pyruvate (Sigma-Aldrich ; #S8636)
- 1% Pénicilline/Streptomycine (Sigma-Aldrich ; #P0781)
- 1% acide aminés non essentiels 100x (Sigma-Aldrich ; #M7145)
- 0.1% 2-mercaptoethanol (50µM)
- 100U/ml IL-2 recombinante bovine ((Boysen et al., 2006b))

- *Conditions de culture*

Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂.

Annexe 3 : Les étapes du western blot

➤ *Préparation des échantillons*

Dans notre cas, les échantillons ont été mis en présence d'un tampon de charge réducteur (cf. annexe 1 pour la composition). Le bleu de bromophénol contenu dans ce tampon, lui confère ses propriétés réductrices c'est à dire qu'il va permettre la suppression de certaines formes de repliement tertiaire des protéines en clivant les ponts di-sulfures mais également les structures quaternaires en dissociant les sous unités.

Les échantillons sont chauffés pendant 10 minutes à 100°C au bain marie puis incubés 10 minutes dans la glace. L'ébullition dénature les protéines en brisant les faibles liaisons intramoléculaires, ce qui a pour conséquence de les dérouler complètement.

➤ *Électrophorèse sur gel de polyacrilamide*

Les échantillons sont déposés dans les puits du gel de polyacrylamide qui comprend deux zones de compositions différentes. Le **gel de concentration** (cf annexe 1 pour sa composition) a pour but de concentrer l'échantillon jusqu'à l'obtention d'une zone protéique très fine. La deuxième partie du gel, **gel de séparation** (cf annexe 1 pour sa composition) permet la séparation des protéines en fonction de leur taille. Le gel est positionné dans une cuve contenant du tampon de migration (cf annexe 1 pour la composition) et l'application d'un courant électrique de 130 volts pendant environ 1h, fait migrer les protéines.

➤ *Transfert sur membrane de nitrocellulose*

Les protéines séparées sont transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose (BioScience) afin de détecter les protéines d'intérêt avec les anticorps. Sur l'appareil servant au transfert « Graphite Electrobloetter 1 » (Millipore), sont placées, trois feuilles de papier Whatman, imbibées de tampon de transfert (cf annexe 1 pour sa composition), la membrane de nitrocellulose, puis le gel et enfin trois autres feuilles de papier Whatman. Un courant électrique dont le voltage est calculé en fonction de la taille de la membrane ($0.8\text{mA}/\text{cm}^2$), est appliqué (pendant 1 heure) et les protéines chargées sont transférées du gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques non spécifiques.

➤ ***Blocage des sites de liaison non spécifiques***

Les anticorps peuvent se lier à la membrane de nitrocellulose de manière non spécifique. Pour minimiser cela, les sites non spécifiques de la membrane de nitrocellulose sont saturés en la plongeant dans une solution riche en protéines. Dans notre cas, nous avons utilisé un tampon TNT (cf annexe 1 pour sa composition) auquel on rajoute 3% de lait. Les protéines du lait se lient à la membrane, dans tous les sites non occupés par les protéines transférées. Ainsi, les anticorps appliqués lors de l'étape suivante, ne peuvent se fixer que sur les sites de liaison de la protéine cible, ce qui réduit le "bruit de fond".

➤ ***Détection de la protéine recombinante***

Pour la détection de la protéine cible (NKp46-Fc), la membrane a été mise en présence d'un anticorps anti-Fc couplé à la phosphatase alcaline (Sigma) préalablement dilué en tampon TNT supplémenté en lait (1%), pendant 30 minutes à température ambiante et sous agitation. Après lavage, la membrane est incubée avec le substrat de la phosphatase alcaline (kit BCIP-NBT 1-Component Phosphatase Substrate, KPL, #50-81-18,) pendant 15-20 minutes sous agitation à température ambiante puis lavée rapidement à l'eau.

Annexe 4 : Purification, dialyse et concentration de la protéine recombinante

➤ *Purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC)*

La chromatographie permet de séparer des constituants d'un mélange même très complexe. Nous avons utilisé cette méthode pour isoler la protéine recombinante soluble NKp46-Fc à partir du surnageant de culture des cellules transfectées.

L'appareil de chromatographie est constitué de plusieurs composants :

- **Une réserve de liquide** (éluant) contient la **phase mobile** en quantité suffisante.
- **La pompe**, permet d'aspirer la phase mobile afin qu'elle soit constamment présente dans le circuit.
- La vanne d'injection, correspond à **un injecteur** à boucle d'échantillonnage. Ce système permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour une analyse quantitative.
- **La colonne** contient une phase stationnaire qui dans notre cas correspond aux billes de sépharose couplées à des protéines G (HiTrap[™]Protein G HP, Life Sciences, #17-0405-01). Les protéines G vont se lier à la partie Fc de la protéine recombinante et ce couplage est très dépendant du pH : la liaison est très forte à pH 7. Par contre à pH acide (2.5-3), l'affinité est beaucoup moins importante. C'est pourquoi au moment de l'éluion il suffit de travailler avec un tampon acide pour récupérer la protéine d'intérêt. Les éluats sont récupérés dans différents tubes par fractions de 2ml. En suivant en direct l'évolution de la densité optique (DO) il est possible de voir dans quel tube se trouve la protéine.
- **Le détecteur** UV-visible, mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. Cela se traduit par l'apparition d'un pic de DO. Il est ainsi possible de calculer la quantité de protéine récupérée en appliquant la loi de Beer Lambert :

$$\text{Concentration} = \frac{\text{DO} \times \text{dilution}}{\text{Coefficient d'extinction molaire}}$$

➤ *Dialyse*

La protéine récupérée après le passage sur la colonne HPLC se trouve dans un tampon riche en sel, qu'il faut éliminer. En effet, pour immuniser les souris, la protéine doit se trouver dans un milieu neutre. La méthode la plus utilisée pour changer la concentration en sel d'une solution est la **dialyse**. Les protéines en solution dans le tampon riche en sel sont introduites dans une cassette et séparées d'une solution de concentration saline différente par une membrane poreuse. Par osmose, les concentrations salines vont s'équilibrer de part et d'autre de la membrane. En utilisant un volume de tampon de dialyse beaucoup plus grand que celui de la solution protéique, on peut ainsi changer rapidement sa teneur en sels. Dans notre cas, la cassette de dialyse a été hydratée avec le tampon (PBS 1X). La cassette contenant les protéines (2ml) est placée dans un bécher contenant un litre de PBS, laissé sous agitation à +4°C et la protéine est récupérée le lendemain.

➤ *Concentration*

Lors de l'immunisation des souris, le volume d'injection doit être le plus faible possible, soit un volume maximal de 100 à 500µl en fonction du site d'injection. Afin de concentrer notre protéine, nous avons utilisé un dispositif (Minicon® concentrator, Millipore) composé de cellules contenant une membrane d'ultrafiltration et de coussinets qui absorbent l'eau de l'échantillon.

Annexe 5 : Obtention des hybridomes

L'hybridome est un hybride artificiel construit à partir d'une cellule lymphoïde productrice d'anticorps et d'une cellule myélomateuse (immortelle). Les souris doivent être histocompatibles avec les cellules myélomateuses utilisées pour construire l'hybridome. Nous avons utilisé des souris Balb/c et des cellules myélomateuses issues de cette lignée murine, les cellules sp2/0.

Au moment de la fusion, les splénocytes et les cellules de myélomes sont mis en présence de polyéthylène glycol (PEG), un agent de fusion des membranes plasmiques des cellules eucaryotes. Les cellules de myélome utilisées ont été préalablement sélectionnées pour leur déficience en une enzyme : l'hypoxanthine-guanidine phosphoribosyl-transférase (HGPRT). En effet, les cellules eucaryotes disposent de deux voies distinctes pour synthétiser les nucléotides : la voie de néo-synthèse à partir de sucres et d'acides aminés et la voie alterne à partir de nucléosides. L'HGPRT assure une étape essentielle de la voie alterne. La déficience en HGPRT conduit à l'utilisation de la voie de néo-synthèse qui peut être bloquée par des drogues telles que l'aminoptérine. Une fois la fusion effectuée, les cellules sont mises en présence de milieu de sélection Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine (HAT). La présence d'aminoptérine dans le milieu permet de se débarrasser des cellules de myélome qui n'ont pas fusionné et ainsi de ne sélectionner que les cellules hybrides, qui, par complémentarité génique expriment une enzyme HGPRT fonctionnelle et sont donc capables d'utiliser la voie alterne de synthèse de nucléotides. Les lymphocytes B qui n'ont pas fusionné vont disparaître au bout de quelques jours puisque, comme toute cellule normale, ils sont incapables de se multiplier pendant longtemps *in-vitro*.

Liste des travaux

Publications

Elhmouzi-Younes J., Boysen P., Pende D., Storset A.K., Le Vern Y., Laurent F., Drouet F., Ovine CD16⁺/CD14⁻ blood lymphocytes present all the major characteristics of Natural Killer cells. *Veterinary Research*, pubmed (2009), 1: 04-15.

Elhmouzi-Younes J., Storset A.K., Boysen P., Laurent F., Drouet F., Bovine neonate Natural Killer cells are fully functional and highly responsive to Interleukin-15 and to NKp46 receptor stimulation. *Veterinary Research* (2009), 40: 54-68.

Communications orales

Elhmouzi-Younes J., Storset A.K., Boysen P., Laurent F., Drouet F., Particularités fonctionnelles des cellules Natural Killers des bovins nouveau-nés. Journées d'Animation Scientifique de l'IFR136, Tours, 12-13 mars 2009.

Elhmouzi-Younes J., Storset A.K., Boysen P., Laurent F., Drouet F., Caractérisation des cellules NK des bovins nouveau-nés. 21^{ème} colloque Biotechnocentre, Seillac, 23-24 octobre 2008. Obtention du prix de la meilleure communication affichée présentée oralement.

Elhmouzi-Younes J., Storset A.K., Boysen P., Laurent F., Drouet F., Caractérisation des cellules Natural Killer des bovins nouveau-nés. Immunologie des Animaux Domestiques, Tours, 16 octobre 2008.

Elhmouzi-Younes J., Storset A.K., Boysen P., Laurent F., Drouet F., Characterisation of NK cells from bovines neonates. Journée des Thésards en anglais, INRA Nouzilly, 19 septembre 2008. Obtention du prix de la meilleure communication orale

Elhmouzi J., Chaussé A.M., Drouet F., Storset A., Laurent F., Production d'anticorps monoclonaux permettant d'étudier les cellules Natural Killers des petits ruminants. Immunologie des Animaux Domestiques, Montpellier, 6-7 novembre 2007.

Présentations sous forme d'affiches

Elhmouzi-Younes J., Boysen P., Pende D., Storset A.K., Le Vern Y., Laurent F., Drouet F., Ovine CD16⁺/CD14⁻ blood lymphocytes present all the major characteristics of Natural Killer cells. 3rd congress EVIW, Berlin, 10-13 septembre 2009

Elhmouzi-Younes J., Storset A.K., Boysen P., Laurent F., Drouet F., Bovine neonate Natural Killer cells are fully functional and highly responsive to interleukin-15 and to NKp46 receptor stimulation. 3rd congress EVIW, Berlin, 10-13 septembre 2009

Elhmouzi-Younes J., Storset A.K., Boysen P., Laurent F., Drouet F.. Functional properties of Natural Killer cells from bovine neonates.
Journées d'Animation Scientifique du département Santé Animale, Port d'Albret, 25-28 mai 2009. Obtention du prix du meilleur poster

Elhmouzi-Younes J., Storset A.K., Boysen P., Laurent F., Drouet F., Characterisation of NK cells from bovine neonates.
21^{ème} colloque Biotechnocentre, Seillac, 23-24 octobre 2008. Obtention du prix du meilleur poster

Drouet F., Lemoine R., **Elhmouzi J.**, Le Vern Y., Lacroix-Lamandé S., Laurent F., Ontogenèse des cellules Natural Killers dans l'intestin de l'animal nouveau-né et recrutement au cours de l'infection par *Cryptosporidium parvum* ; participation des cellules NK à la production précoce d'interféron gamma.
Journées Biotechnocentre, Seillac, 25-26 octobre 2007

Drouet F., Lemoine R., **Elhmouzi J.**, Le Vern Y., Lacroix-Lamandé S., Laurent F., Cellules impliquées dans la production précoce d'interféron gamma au cours de l'infection de l'animal nouveau-né par *Cryptosporidium parvum* : participation des cellules NK ?
Journées d'animation scientifique du Département de Santé animale, 25-27 juin Tours 2007



Jamila ELHMOUZI-YOUNES



**Les cellules Natural Killer des ruminants
Première caractérisation des cellules Natural Killer
ovines et de bovin nouveau-né**

Résumé

Les nouveau-nés, dont le système immunitaire adaptatif est encore en développement sont souvent plus sensibles aux infections que les adultes. L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes et en particulier les cellules Natural Killer (NK), via leur fonction cytotoxique et leur production d'interféron-gamma (IFN- γ).

Dans le but de pouvoir étudier, à terme, l'implication des cellules NK des ovins nouveau-nés dans un contexte infectieux, nous avons mis en place une stratégie permettant d'isoler et de caractériser ces cellules pour la première fois. En attendant que cette méthode soit mise au point, nous avons recherché les particularités des cellules NK des nouveau-nés chez les bovins pour lesquels un anticorps dirigé contre le récepteur NKp46 spécifique des cellules NK est disponible.

Nous avons observé que, bien que moins nombreuses dans le sang périphérique, les cellules NK des nouveau-nés prolifèrent rapidement, sont totalement fonctionnelles et répondent fortement (cytotoxicité et production d'IFN- γ) après culture en présence d'IL-15 et lors de la stimulation du récepteur NKp46 (Elh mouzi-Younes et al., 2009b). Nous avons pu caractériser les cellules NK ovines, parmi les cellules mononuclées du sang périphérique, en mettant en place une méthode basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre le marqueur CD14, spécifique des monocytes, et le récepteur CD16 exprimé par les cellules NK et les monocytes. Les cellules CD16⁺/CD14⁻ présentent toutes les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles fondamentales des cellules NK (Elh mouzi-Younes et al., 2009a).

Mots clés : cellule NK / bovin / ovin / cytotoxicité / IFN- γ / interleukine

Résumé en anglais

Neonates are often more susceptible to infections than adults, due to their adaptive immune system still in development. Natural Killer (NK) cells are key cells of the innate immune system which provide early resistance to infections through their cytotoxic properties and production of interferon-gamma (IFN- γ).

In order to study the involvement of NK cells from ovine neonates during an infection we developed, a method to isolate and characterize these cells for the first time. While this method was developed, we investigated the peculiarities of bovine neonate NK cells as an antibody directed against the NKp46 receptor specific of bovine NK cells is available.

On the one hand, we found that although less numerous in peripheral blood, neonate NK cells proliferated actively, were totally functional and highly responsive (cytotoxicity and IFN- γ production) to IL-15 and to NKp46 receptor stimulation (Elh mouzi-Younes et al., 2009b). On the other hand, we characterized ovine NK cells, among peripheral blood mononuclear cells, after developing a strategy based on the use of antibodies against the CD14 marker, specific of monocytes, and the CD16 receptor expressed by NK cells and monocytes. We found that CD16⁺/CD14⁻ cells present all the morphological, phenotypical and functional characteristics of NK cells (Elh mouzi-Younes et al., 2009a).

Key words: NK cells / bovine / ovine / cytotoxicity / IFN- γ / interleukin