

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier tous ceux et celles qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Je commencerai par Monsieur le Professeur Jacques Boniver, responsable du service d'Anatomie et de Cytologie pathologiques pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son service.

Monsieur le Professeur Philippe Delvenne pour la supervision de ce travail.

Le docteur Nathalie Jacobs pour son accueil, son écoute, son accompagnement et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Virginie Renoux, Estelle Dortu et Patrick Roncarati pour leur aide, leurs conseils et l'initiation aux différentes techniques.

Ainsi que tout les membres du laboratoire pour m'avoir intégré dans la vie quotidienne du laboratoire .

Je voudrais aussi remercier ma famille pour leur soutien tout au long de mes études et mes amis pour leur présence.

Résumé

De plus en plus d'études mettent en avant l'importance de l'immunité innée, et plus particulièrement celle des lymphocytes innés tel que les cellules NK et les cellules TCR $\gamma\delta$ dans les réponses immunitaires (Guerra et al., 2008; Liu et al., 2008). Le papillomavirus humain (HPV) est reconnu comme étant le principal agent causatif du cancer du col de l'utérus et de ses lésions précurseurs (SIL : Squamous intraepithelial lesions) (Walboomers et al., 1999). Le système immunitaire joue un rôle important dans le développement de ce type de cancer. Ceci a été démontré par une plus grande incidence des lésions cervicales chez les patients immunodéprimés lors d'une infection par HIV (virus d'immunodéficience humaine) (Ellerbrock et al., 2000) ainsi que la mise en évidence d'anomalies immunitaires dans la TZ (zone de transformation) et dans les SIL (Squamous Intraepithelial Lesion) (Giannini et al., 1998; Jacobs et al., 2003).

Nous avons d'abord voulu déterminer les différentes sous-populations de cellules NK et TCR $\gamma\delta$ au sein des SIL au moyen de nouveaux marqueurs permettant une meilleure caractérisation celles-ci.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'interaction des cellules NK avec le virus HPV. Nous voulions déterminer si celui-ci induisait une prolifération de cellules NK. Nous avons donc mis au point le test de prolifération au CFSE sur un petit nombre de cellules et utilisé des VLP d'HPV16, car cette souche d'HPV se retrouve dans plus de 50% des cancers du col de l'utérus.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de MICA (MHC class I-related chains A), connu pour être un ligand du récepteur activateur NKG2D des cellules NK (Pende et al., 2001), sur les lignées CaSki et SiHa (HPV positives) par rapport à la lignée C33a (HPV négative). Nous avons également étudié l'effet du TGF β 1 (Tumor Growth Factor β 1) sur l'expression de MICA de ces lignées car celui-ci est présent dans la TZ et il a été démontré au laboratoire qu'il augmentait l'expression de MICA sur les cellules CaSki.

Trop peu d'expériences ont été réalisées sur les populations lymphocytaires des lésions et l'effet prolifératif des VLP d'HPV sur les cellules NK pour tirer des conclusions. Toutefois les techniques sont maintenant bien mises au point pour réaliser d'autres expériences.

Les résultats ont confirmé ceux obtenus précédemment par le laboratoire d'accueil pour l'expression de MICA à la surface des lignées cellulaires mais pas pour les effets du TGF β 1 sur les cellules CaSki. Nous avons toutefois mis en avant une diminution de prolifération et l'induction de changements morphologiques dus au TGF β 1 sur les lignées HPV positives

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC :	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN :	acide désoxyribonucléique
APC :	Antigen Presenting Cell
BCR :	B Cell Receptor
BSA :	Bovin Serum Albumin
CD :	Cluster of Differentiation
CFDA-SE :	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CFSE :	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSF-1 :	Colony Stimulating Factor 1
DMSO :	Dimethylsulfoxyde
EDTA :	acide éthylènediaminotétraacétique
EGF :	Epidermal Growth Factor
FACS :	Fluorescent Activated Cell Sorter
FCS :	Fetal Calf Serum
FITC :	Isothiocyanata de fluorescéine
FSC :	Forward Scatter
g :	gramme
g :	acceleration radiale
GAM :	Goat Anti Mouse
GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
HIV :	Human Immunodeficiency Virus
HLA :	Human Leukocyte Antigen
HPV :	Human Papillomavirus
HSP70 :	Heat Shock Protein 70
Ig :	immunoglobuline
IL :	interleukine
ITAM :	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
kDa :	kilo Dalton
KIR :	Killer cell Immunoglobulin-like Receptor
KN :	kératynocytes normaux
LCR :	Long Control Region
ml :	milliliter
mM :	millimolaire
MACS :	Magnetic Activated Cell Sorter
MHC :	Major Histocompatibility Complex
MIC :	MHC class I related chain
MIF :	moyenne d'intensité de fluorescence
NCR :	Natural Cytotoxicity Receptor
ng :	nanogramme
NK :	Natural Killer
ORF :	Open Reading Frame
PAF :	paraformaldéhyde
PB :	Pacific Blue
PBMC :	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS :	solution saline tamponnée de phosphate
PDGF :	Platelet-Derived Growth Factor
PE :	Phycoérythrine

PerCP :	fluorochrome compose d'un complexe naturel de peridinine et de chlorophylle
PHA :	phytohémagglutinine
PI-3 :	phosphatidylinositol 3
PMT :	photomultiplicateur
pRB :	protéine du rétinoblastome
Sf9 :	Spodoptera frugiperda 9
SIL :	Squamous Intraepithelial Lesion
SSC :	Side Scatter
TCR :	T Cell Receptor
TGF :	Transforming Growth Factor
TLR :	Toll-like receptor
TZ :	zone de transformation
ULBP :	UL-16 Binding Protein
VLP :	Virus Like Particle
2-ME :	2-mercaptoéthanol
µm :	micromètre

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
A. Cancer du col de l'utérus	1
B. Le papillomavirus humain	3
C. Les Virus-Like Particles (VLP)	6
D. Le système immunitaire	8
1. Rappels généraux sur le système immunitaire	8
2. Anomalies de l'immunité dans la TZ	8
E. Les cellules Natural Killer (NK)	9
1. Généralités	9
2. Réponses cytotoxique et récepteurs membranaires	10
2.1. Les récepteurs inhibiteurs	11
2.2. Les récepteurs activateurs	12
2.2.1. Les récepteurs naturels cytotoxiques (NCR)	12
2.2.2. Le récepteur de faible affinité pour les Ig	12
2.2.3. NKG2D et ses ligands	13
F. Les lymphocytes TCR $\gamma\delta$	15
 OBJECTIF ET PLAN DE TRAVAIL	 17
 MATERIEL ET METHODES	 18
A. Matériel	18
1. Milieu de culture	18
2. Solutions	18
3. Cytokines	19
4. Pseudo particules virales ou VLP (Virus Like Particles)	20
5. Lignées cellulaires	20
B. Méthodes	21
1. Culture cellulaire	21
1.1. Culture des cellules CaSki, SiHa et C33a	21
1.2. Mise en culture des lignées avec le TGF- β 1	21
2. PBMC et cellules NK	21
2.1. Séparation des PBMC à partir d'un buffy coat	21
2.2. Mise en culture des PBMC avec ou sans IL-2	22
2.3. Tri négatif des cellules NK	22
3. Test de prolifération des cellules NK en co-culture avec des VLP-HPV	23

4. Phénotype	25
4.1. Analyse des marqueurs de surface par cytométrie en flux	25
4.2. Phénotype sur le PBMC	28
4.3. Marquage MICA sur lignées cellulaires	29

RESULTATS 30

A. Caractérisation des cellules NK et TCR $\gamma\delta$	30
1. Dans le sang périphérique	30
2. Etude préliminaire de populations NK et TCR $\gamma\delta$ au sein des lésions cervicales ...	34
B. Interaction des cellules NK avec les VLP de HPV 16	39
1. Tri négatif des cellules NK	39
2. Effet prolifératif des VLP d'HPV 16 sur les cellules NK	40
C. Expression de MICA à la surface des cellules HPV+	45
1. Lignées HPV+ vs lignées HPV-	46
2. Effet du TGF- β 1 sur les lignées cellulaires	47

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 50

BIBLIOGRAPHIE 55

INTRODUCTION

A. Cancer du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus est le second cancer le plus commun rencontré chez les femmes au niveau mondial après le cancer du sein. Il touche toutefois des femmes plus jeunes que ce dernier. D'après les données du Global Cancer Statistics, 493.000 nouveaux cas et 274.000 morts ont été dénombrés dans le monde au cours de l'année 2002. Quatre-vingt-trois % des cas de cancer du col de l'utérus se retrouvent dans les pays en voie de développement (Parkin et al., 2005).

Le cancer du col de l'utérus est dû dans 99,7% des cas à une infection par le papillomavirus humain (HPV) (Walboomers et al., 1999). Plus de 100 types d'HPV ont été identifiés dont 40 infectent le tractus génital (de Villiers et al., 2004). L'infection cervicale par HPV est la maladie sexuellement transmissible la plus commune. En effet, 46% des femmes sont infectées 3 mois après le début de leur vie sexuelle (Collins et al., 2002).

L'infection par HPV est nécessaire mais non suffisante pour le développement d'un cancer du col de l'utérus ; la plupart des lésions chez les femmes infectées par HPV n'évoluent pas en cancer du col mais régressent spontanément. Parmi les types infectant le tractus génital, on peut distinguer les génotypes à bas risque (HPV 6, 11, 34, 40, ...) et à haut risque oncogénique (HPV16, 18, 31, 45, ...) (Doorbar, 2006; Munoz et al., 2003; zur Hausen, 2002) (Fig. 1).

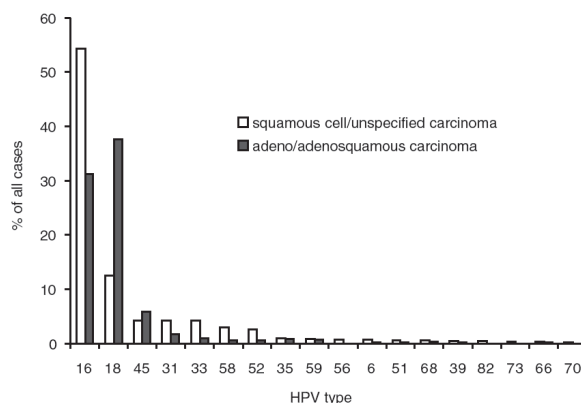


Fig. 1 : Prévalence d'HPV de haut risque par type dans 10.058 cas de cancer invasif du col de l'utérus par type histologique dans le monde (Clifford et al., 2003).

D'autres facteurs semblent favoriser le développement du cancer du col de l'utérus comme par exemple les grossesses multiples (Munoz et al., 2002), une contraception orale prolongée (Lacey et al., 1999) et le tabagisme (Prokopczyk et al., 1997). Le système immunitaire joue également un rôle important dans l'évolution du cancer. Une hausse de l'incidence du cancer du col est observée chez des patientes immunodéprimées, lors d'une infection par HIV par exemple (Ellerbrock et al., 2000).

Le cancer du col de l'utérus se développe principalement dans une région spécifique du col appelée zone de transformation (TZ) qui se situe entre l'endocol et l'exocol (Burghardt and Ostor, 1983) (Fig.2).

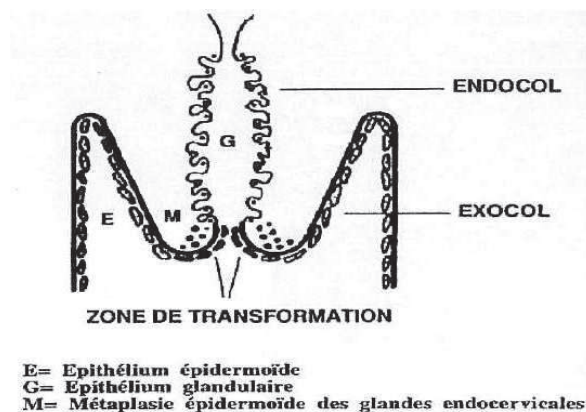


Fig. 2 : Représentation de la zone de transformation située entre l'endocol et l'exocol

Dans les conditions physiologiques, cette région est soumise à un processus métaplasique où l'épithélium glandulaire se transforme progressivement en épithélium épidermoïde.

Différents stades précancéreux existent. Ils sont appelés SIL pour Squamous Intraepithelial Lesions. On distingue 2 types de SIL ; les SIL de bas grade correspondant à des changements cellulaires sur 1/3 de l'épithélium et des SIL de haut grade correspondant à des dysplasies modérées ou sévères (Kurman et al., 1991) (Fig. 3).

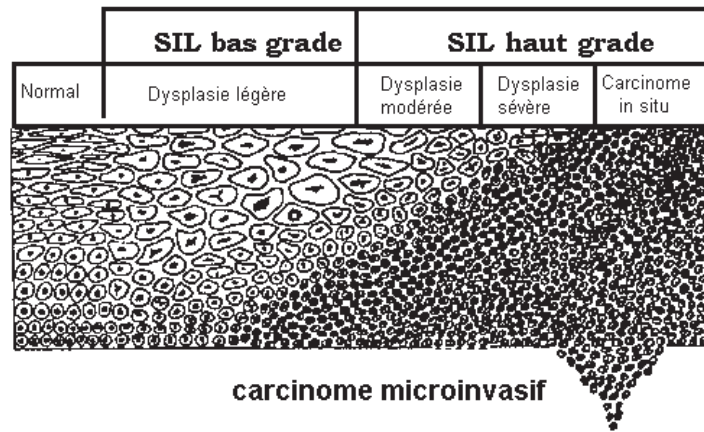


Fig. 3 : Représentation des différents stades de l'épithélium normal au carcinome invasif.

B. Le papillomavirus humain

Le papillomavirus humain (HPV) fait partie de la famille des *papovaviridae*. Cette famille englobe des virus non enveloppés avec un génome d'ADN double brin circulaire. Deux groupes de virus se distinguent dans cette famille par des tailles différentes du génome dont l'organisation est totalement différente et sans similarité majeure du point de vue séquence en nucléotide ou acides aminés. C'est pourquoi aujourd'hui cette famille est scindée en deux : les *Polyomaviridae* et les *Papillomaviridae*. Une centaine de types d'HPV sont identifiées d'après l'Open Reading Frame (ORF) de L1, codant pour une protéine de capsid, qui est le gène le plus conservé de leur génome (de Villiers et al., 2004).

La prévalence des différents types d'HPV varie selon les régions du monde. On peut remarquer que partout dans le monde, c'est l'HPV de type 16 qui prédomine, en proportions toutefois différentes. Pour les autres types, on constate de grandes variations d'une partie du monde à une autre (Bosch et al., 1995).

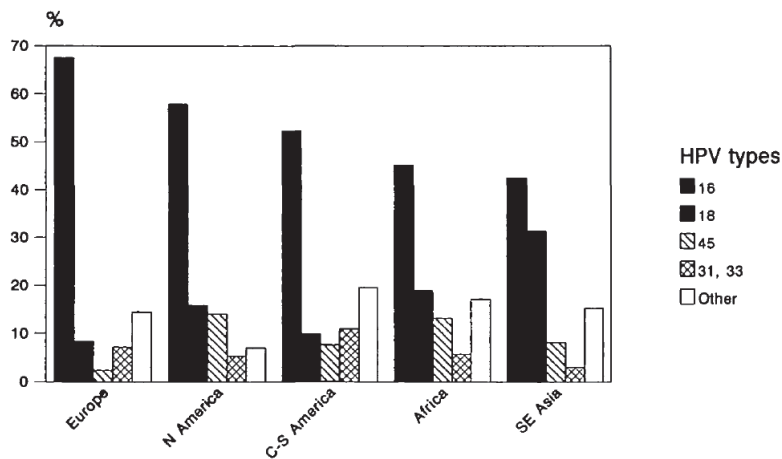


Fig 4 : Distribution des principaux types d'HPV chez les individus infectés donnés en pourcentage du total des HPV identifiés dans les régions suivantes : Europe, Amérique du Nord, Amérique centrale et du Sud, Afrique et Asie du Sud-Est (Bosch et al., 1995).

Le génome des différents types d'HPV peut varier légèrement en taille, il contient typiquement 8000 paires de bases qui codent pour 8 principaux ORF (Fig.5).

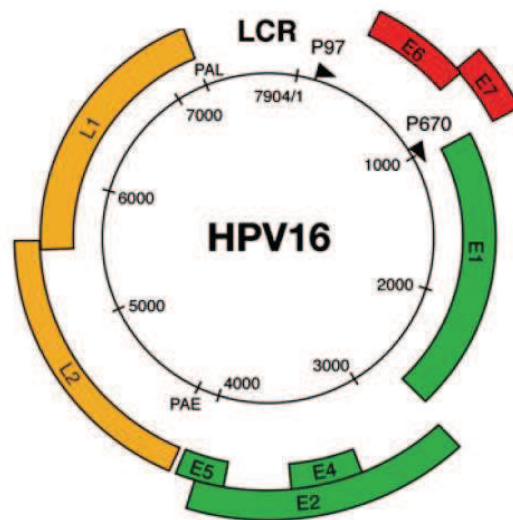


Fig. 5 : Schéma du génome du papillomavirus humain (Doorbar, 2006)

Le génome est entouré d'une capsidie icosaédrique constituée de 2 protéines : la protéine L1, l'élément structural majeur dont les virions infectieux contiennent 360 copies organisées en 72 capsomères et la protéine mineure de capsidie L2 présente au centre des capsomères. Le L correspond à « Late » du fait que ces protéines sont traduites tardivement dans le cycle de vie du virus.

Les autres gènes codent pour les protéines « Early », protéines non structurales traduites plus tôt dans le cycle du virus. E1 et E2 sont essentielles à la réplication virale, elles sont vitales

pour la réplication de l'ADN extrachromosomal. E4 est impliquée dans l'encapsidation du génome et induit également le collapsus du réseau de cytokératines cytoplasmiques des kératinocytes humains, ce qui favorise la sortie des virions de la cellule infectée.

E5 interagit avec plusieurs protéines transmembranaires comme le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor), le PDGF β (Platelet-Derived Growth Factor β) et le CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1), rendant les cellules plus sensibles à ces facteurs de croissance (Motoyama et al., 2004).

E6 et E7 sont les oncoprotéines virales et jouent un rôle important dans la transformation cancéreuse. E6 a la particularité de se lier à la protéine p53, ce qui induit une instabilité chromosomique et donc augmente le taux de mutation dans les cellules infectées. La présence de E6 favorise également l'intégration d'ADN étranger dans le génome de la cellule. La protéine E7 a la capacité de se lier à la protéine du rétinoblastome (pRB) et induit sa dégradation. Cette dernière ne pourra donc plus inhiber le facteur de transcription E2F. Ceci poussera la cellule à passer de la phase G1 à la phase S de façon incontrôlée (zur Hausen, 2000).

Le papillomavirus a un tropisme préférentiel pour les cellules épithéliales et en particulier pour celles de la peau ou de la muqueuse génitale et celle de l'oropharynx (zur Hausen, 2000). En effet, ce virus utilise la différenciation de l'épithélium pour sa réplication. Les virions pénètrent l'épithélium par des microabrasions et infectent les cellules de la couche basale. Dans ces cellules, l'ADN viral est répliqué sous la forme d'épisome en utilisant la machinerie de réplication de l'ADN de la cellule. L'expression de E6 et E7 dans ces cellules empêche l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la différenciation des cellules, permettant une réplication virale accrue. Enfin, dans les couches supérieures, une fois que la cellule n'a plus un potentiel réplicatif, les protéines L1 et L2 sont exprimées et s'auto-assemblent, permettant la formation du virion. Celui-ci est alors relâché des cellules épithéliales superficielles (Fig. 6).

Dans le cas d'infection d'HPV de haut risque, l'ADN épisomal est parfois intégré dans l'ADN de l'hôte (Fig. 7). On assiste alors à une surexpression de E6 et E7 due à la perte de la répression par E2. Les cellules acquièrent alors une durée de vie plus longue, gardent la capacité de proliférer indéfiniment et accumulent les mutations génétiques. Ce phénomène est le début de la dysplasie qui peut régresser spontanément ou évoluer en cancer invasif (Frazer, 2004).

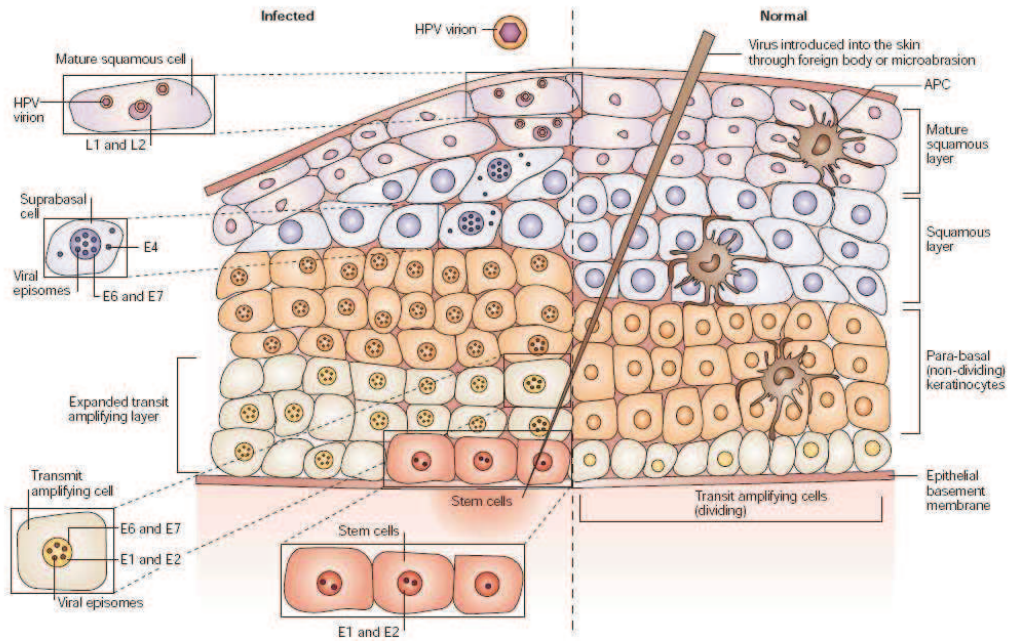


Fig. 6 : Localisation des principaux stades du cycle de vie du papillomavirus humain dans un épithélium épidermoïde (Frazer, 2004)

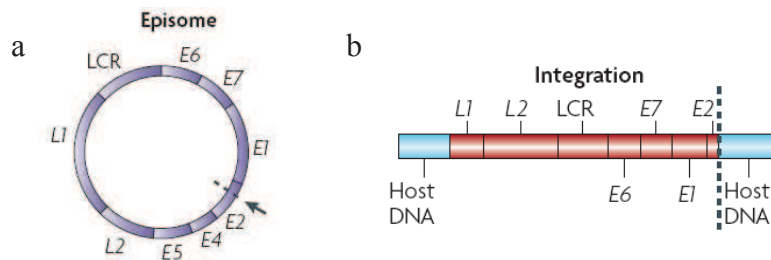


Fig. 7 : Représentation de la forme épisomale (a) et intégrée du génome HPV (Frazer, 2004).

C. Les Virus-Like Particles (VLP)

Les virions d'HPV sont très difficiles à produire *in vitro* car ils nécessitent la différenciation complète de l'épithélium pour sa réplication. En effet, les protéines non-structurales sont facilement exprimées par des cellules en culture, mais les protéines structurales L1 et L2 ne sont pas normalement exprimées. Cela a ralenti la caractérisation de ces protéines ainsi que la propagation du virus en culture. C'est pourquoi lorsque l'on veut étudier le caractère infectieux et l'interaction avec des cellules de ce virus, on utilise des Virus-Like Particles (VLP) d'HPV (Fig. 8).

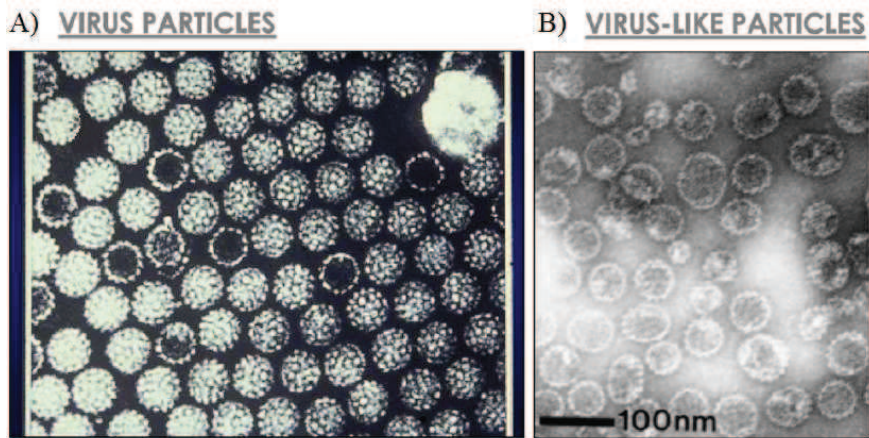


Fig. 8 : Photos de microscopie électronique représentant en A des virions HPV et en B des VLP d'HPV (Stanley et al., 2006).

Afin de produire ces VLP, un système d'infection de cellules d'insecte Sf9 (*Spodoptera frugiperda* 9) par des baculovirus recombinants transfectés avec un vecteur contenant le gène de la protéine L1 (Kawana et al., 1998) ou de levures *Saccharomyces cerevisiae* auxquelles un vecteur d'expression contenant la protéine L1 (Hofmann et al., 1995) est utilisé. Dans ces systèmes, la protéine L1 est exprimée en quantité suffisante, ce qui permet son auto-assemblage. L'auto-assemblage du capsomère peut être démontré en désassemblant les pseudovirions récoltés dans les cellules Sf9 avec l'agent réducteur 2-mercaptothanol (2-ME). Elles se reforment alors toutes seules et sont morphologiquement similaires aux VLP issus des cellules Sf9 (Kawana et al., 1998). Leur structure est identique à celle des virions d'HPV mais ne contient aucun matériel génétique. Ces VLP sont donc totalement inoffensifs car ils ne contiennent pas le génome du virus.

Les VLP d'HPV sont utilisées comme vaccins prophylactiques contre l'infection par HPV 16 et 18, responsables de la majorité des cancers du col de l'utérus et des verrues génitales. Il a été démontré qu'elles induisent un haut titre de production d'anticorps dirigés contre L1 (Kirnbauer et al., 1992). Deux vaccins sont disponibles à ce jour sur le marché. Le Gardasil[®], commercialisé par Merck & Co et produit en système de levure, est un vaccin quadrivalent contenant les VLP d'HPV de type 6, 11, 16 et 18 (HPV 6 et 11 ne sont pas retrouvés dans les cancers, mais sont responsables des verrues génitales). Le Cervarix[®], commercialisé par GlaxoSmithKline Biologicals est lui un vaccin bivalent composé de VLP d'HPV de type 16 et 18 (Hsueh, 2009) produites en système de cellules d'insecte. Pour les deux vaccins, la protection est efficace à 100% pendant au moins 5 ans contre une infection par des HPV de type vaccinal, mais l'efficacité reste faible chez les femmes déjà infectées (Cutts et al., 2007).

D. Le système immunitaire

1. Rappels généraux sur le système immunitaire

Le système immunitaire est le moyen de défense des êtres vivants contre les différents pathogènes et les cellules cancéreuses. Au sein de ce système, on retrouve deux composantes : l'immunité innée (ou naturelle) et l'immunité acquise (ou adaptative).

L'immunité innée est un ensemble qui n'est pas spécifique d'un pathogène en particulier. Il agit très rapidement après le début de l'infection et constitue donc la première ligne de défense de l'organisme. Elle se compose notamment de barrières anatomiques, comme la peau et les muqueuses, du système de protéines du complément et des protéines de la phase aigüe de l'inflammation. On y retrouve également des composantes cellulaires ; il s'agit des cellules phagocytaires, des cellules présentatrices d'antigènes et des lymphocytes innés tels que les cellules NK, les lymphocytes TCR $\gamma\delta$ et les cellules NKT.

L'immunité adaptative peut reconnaître et éliminer spécifiquement un pathogène. Sa mise en place est plus lente et elle n'est effective que quelques jours après l'infection. Elle possède en plus la capacité de mémoire qui permet une réponse plus importante lors d'une deuxième rencontre avec le pathogène. Elle est principalement composée de deux types cellulaires, les lymphocytes B qui secrètent des anticorps et les lymphocytes T qui peuvent sécréter diverses cytokines et exercer une activité cytotoxique.

Nous décrivons plus en détail les cellules NK et les lymphocytes $\gamma\delta$ qui font l'objet de ce mémoire.

2. Anomalies de l'immunité dans la TZ

Différentes études ont pu démontrer une diminution du nombre de cellules de Langherans dans les SIL et dans la TZ (Giannini et al., 2002) ainsi qu'une diminution du nombre de lymphocytes T CD8⁺ dans des cultures dérivées de SIL comparé à l'exocol normal (Jacobs et al., 2003).

De plus, dans la TZ et les lésions de bas ou de haut grade, une augmentation significative des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF β de type 1 est observée. Or ces 2 cytokines ont la capacité d'interférer avec l'induction d'une réponse immunitaire de type 1 par les cellules présentatrices d'antigènes. Ces cytokines contribueraient donc à une prédisposition de la TZ à la carcinogénèse et expliqueraient en partie l'inefficacité des réponses antitumorales et antivirales (Giannini et al., 1998).

Dans les lésions de haut grade, un déficit d'IL-12 est constaté (Giannini et al., 1998), ce qui affaiblit d'autant plus le système immunitaire au vu de son importance pour l'activation de médiateurs cellulaires.

E. Les cellules Natural Killer (NK)

1. Généralités

Depuis leur découverte par R. Kiessling en 1975, les cellules NK font encore aujourd'hui l'objet de découvertes intenses au sein de l'immunologie.

Les cellules NK jouent un rôle très important dans l'immunité innée. Elles se caractérisent par leur capacité à détruire des cellules tumorales ou infectées par un virus de manière naturelle, c'est-à-dire sans reconnaissance spécifique via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et sans sensibilisation préalable (Lanier et al., 1986) ; ce qui leur a valu l'appellation « Natural Killer ». Cette première définition est toutefois incomplète, car seule une minorité des cellules NK possède cette activité cytotoxique au repos mais toutes peuvent l'acquérir une fois activées (Caligiuri, 2008).

Les cellules NK jouent un rôle de lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. En effet, une sous-population de ces cellules est capable de sécréter des cytokines qui vont moduler la réponse immunitaire par l'activation d'autres cellules de l'immunité innée et adaptative (Hanna and Mandelboim, 2007).

Morphologiquement, ces sont des cellules lymphoïdes de grande taille qui contiennent des granules intracytoplasmiques. Elles semblent avoir un progéniteur commun avec les lymphocytes T (Sanchez et al., 1994). Phénotypiquement, elles sont définies par l'expression du CD16 (récepteur de faible affinité pour les immunoglobulines) et du CD56 (isoforme de 140kDa de la molécule d'adhésion des cellules neurales), ainsi que par l'absence du CD3, du

TCR et du BCR ; ce qui les différencie bien des lymphocytes T et B. Elles expriment également le récepteur activateur NKp46 qui est présent chez tous les mammifères contrairement au CD56 (Walzer et al., 2007). On retrouve des cellules NK dans le sang, les ganglions lymphatiques et dans différents tissus périphériques tels que la moelle, la rate et l'intestin (Caligiuri, 2008). Les cellules NK représentent environ 10% des lymphocytes circulant dans le sang. Deux populations ont été identifiées et se distinguent par la densité de CD56 exprimé en surface. Environ 90% des cellules NK circulantes expriment faiblement le CD56, mais ont une densité élevée de CD16 en surface. Pour les 10% restant, elles expriment fortement le CD56 et faiblement voire pas du tout le CD16. Ces deux sous-populations sont appelées respectivement CD56^{dim} et CD56^{bright}. Les CD56^{dim} sont les plus cytotoxiques au repos alors que les CD56^{bright} ont besoin d'être activées pour acquérir cette cytotoxicité. Les CD56^{bright} montrent la capacité sécrétoire la plus élevée après activation (Cooper et al., 2001). De nombreuses études mettent en avant qu'en plus de fonctions différentes, les cellules NK CD56^{bright} seraient des précurseurs des CD56^{dim} (Chan et al., 2007; Ferlazzo et al., 2004).

2. Réponse cytotoxique et récepteurs membranaires.

Près de 90% des cellules NK circulantes ont une activité cytotoxique envers les cellules tumorales ou infectées par un virus une fois qu'elles sont activées. Afin de reconnaître les cellules à lyser, elles possèdent deux types de récepteurs différents : des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs. Les cellules NK seront activées et les cellules cibles détruites si et seulement si les signaux activateurs surpassent les signaux inhibiteurs (Fig. 9).

Les cellules NK vont induire l'apoptose des cellules cibles. Pour ce faire, une exocytose massive des granules intracytoplasmiques contenant notamment de la perforine et des granzymes se produit (Chan and Housseau, 2008).

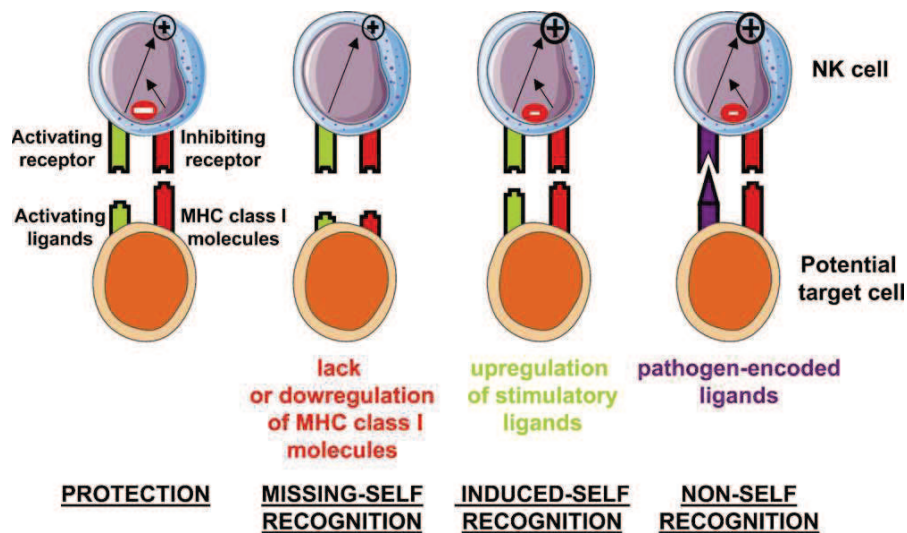


Fig. 9 : Balance des signaux activateurs et inhibiteurs régulant la fonction des cellules NK. La sous-régulation du MHC de classe I, la surexpression de ligand pour récepteurs activateurs ou l'expression de molécules associées à des pathogènes représentent des signaux de stress qui peuvent activer les cellules NK (Luci and Tomasello, 2008).

2.1. Les récepteurs inhibiteurs

Les cellules NK possèdent différents récepteurs inhibiteurs à leur surface. Elles comptent notamment les récepteurs de la famille des Killer cell Immunoglobulin-like receptors (KIR), faisant partie de la superfamille des immunoglobulines qui reconnaissent les différentes formes de HLA de classe I (A, B et C) (Dohring and Colonna, 1996), ainsi que le récepteur CD94/NKG2A, apparenté aux lectines de type C et lient le HLA-E (Lee et al., 1998).

Plus d'une douzaine de KIR différents ont été identifiés dans le génome humain et chaque cellule NK exprime seulement une fraction de ces KIR. De cette manière, il y a un pattern varié d'expression des KIR, ce qui détermine un répertoire divers de cellules NK capables de ressentir rapidement des changements dans l'expression de MHC de classe I (Parham, 2005).

L'expression du HLA-E est régulée par la liaison à des séquences peptides signal des molécules du MHC de classe I. Elle reflète donc l'expression générale des molécules du CMH de classe I classique (Braud et al., 1998).

Ainsi, le mécanisme d'échappement des cellules tumorales ou infectées par un virus aux lymphocytes T qui consiste en une diminution d'expression des molécules du CMH de classe I est contrecarré par les cellules NK. Par contre, les cellules qui gardent une expression normale de CMH de classe I seront protégées de la destruction par les cellules NK.

2.2. Les récepteurs activateurs

Plusieurs familles de récepteurs activateurs sont retrouvées en surface des cellules NK.

2.2.1. Les récepteurs naturels cytotoxiques (NCR)

Il y a tout d'abord les récepteurs naturels cytotoxiques (NCR) qui sont spécifiques des cellules NK et jouent un rôle important dans leur activité cytotoxique. Toutefois, la nature et la distribution cellulaire de leur ligand ne sont pas clairement définies.

Le premier NCR identifié a été le récepteur NKp46. Il est exprimé par toutes les cellules NK et joue un rôle central dans la lyse de cellules cibles. C'est une glycoprotéine transmembranaire de 46 kDa dont le squelette protéique fait 33 kDa. La fraction cytoplasmique ne contient pas de motif activateur (ITAM pour Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif) et est donc couplé à des protéines intracytoplasmiques contenant la séquence ITAM (polypeptides CD3 ζ et FC ϵ R γ). Ces molécules seront phosphorylées après la liaison de NKp46 à un antigène spécifique. Il a été démontré que la protéine humaine avait 58 et 59% de similarité avec celle de la souris et du rat respectivement (Biassoni et al., 1999; Falco et al., 1999).

Le récepteur NKp30 est exprimé par toutes les cellules NK et semble coopérer avec les autres NCR. Il représente le récepteur majeur dans l'induction de la lyse de cellules tumorales qui sont indépendantes des autres NCR. Sa structure est différente de celle des autres NCR.

Le récepteur NKp44 est présent uniquement sur les cellules NK activées. C'est donc le premier marqueur spécifique des cellules NK activées. C'est une glycoprotéine de 44 kDa dont le squelette protéique fait approximativement 29 kDa. Comme pour NKp46, elle ne possède aucune séquence ITAM dans la queue cytoplasmique. Ce récepteur est couplé avec la protéine intracytoplasmique DAP12 qui contient une séquence ITAM et est phosphorylée suite à la liaison du récepteur avec un antigène. (Bottino et al., 2000).

2.2.2. Le récepteur de faible affinité pour les Ig

Un autre récepteur important des cellules NK est un récepteur de faible affinité pour les IgG : le CD16 (FC γ RIII). Ce dernier induit la lyse des cellules opsonisées par des IgG. C'est une protéine transmembranaire d'environ 70 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé sur la majorité des cellules NK. Il induit la lyse des cellules

opsonisées par des IgG. Ce phénomène est appelé cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Fig. 10)

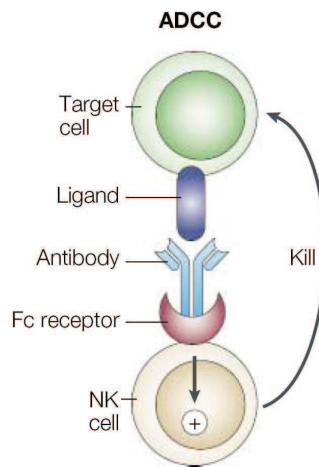


Fig. 10 : Schéma représentant l'ADCC. Les anticorps liés à la surface des cellules cibles sont reconnus par le CD16 qui va induire la lyse de la cellule cible par la cellule NK (Yokoyama and Plougastel, 2003).

Les cellules NK peuvent également être activées via leur Toll-like receptors (TLR) qui sont des récepteurs reconnaissant des motifs conservés sur les microorganismes tels que des glycolipides et des peptidoglycans (Gorski et al., 2006).

2.2.3. NKG2D et ses ligands

NKG2D est exprimé sur toutes les cellules NK et a également été identifié sur les lymphocytes TCR $\gamma\delta$, les lymphocytes T CD8+ $\alpha\beta$ et sur les cellules NKT. Ce récepteur est un membre de la famille des récepteurs lectine de type C, très conservé au cours de l'évolution et localisé sur le chromosome 12p12-p13. NKG2D est un homodimère dont le signal est médié par des adaptateurs spécialisés. Chez l'homme, cet adaptateur est DAP10. DAP10 est un polypeptide transmembranaire qui ne contient pas de motif ITAM mais un motif intracytoplasmique YxxW (Wu et al., 1999). Quand NKG2D est activé, il phosphoryle DAP10 qui à son tour recrute et active la phosphatidylinositol 3 (PI-3) kinase via sa sous-unité régulatrice p85 α qui résulte en une cytotoxicité dépendante des perforines (Hayakawa et al., 2002)

Les ligands de NKG2D sont des protéines de stress surexprimées lors d'une infection microbienne (virale, bactérienne et parasitaire) ou sur les cellules cancéreuses. Dans les

tumeurs, les cellules exprimant des ligands pour NKG2D peuvent devenir des cellules cibles pour les NK et être lysées par ces dernières même si les cellules tumorales expriment encore le MHC de classe I. Cela suggère que des taux de ligands NKG2D assez élevés peuvent surpasser le signal inhibiteur dû à la reconnaissance du MHC de classe I si celui-ci est toutefois un minimum sous-exprimé (Pende et al., 2001). Ces ligands sont les molécules MIC et ULBP.

Les gènes MIC (pour MHC class I related Chain) sont encodés dans la même région que ceux du MHC de classe I et partagent 28 à 35% de similarité de séquence avec ces derniers. Ils ont 3 domaines α extracellulaires et une courte queue intracytoplasmique (Fig. 11). Contrairement au MHC de classe I, ils ne sont pas associés à la β_2 -microglobuline. Les protéines principales de cette famille sont MICA et MICB. Ces molécules sont hautement polymorphiques ; on dénombre près de 60 molécules MICA différentes et 25 pour MICB.

La séquence des promoteurs de ces gènes correspond fortement à la séquence du gène HSP70, confortant l'idée que ces protéines sont induites lors d'un stress cellulaire (Groh et al., 1996). Leur expression est également induite suite à un stress oxydatif (Yamamoto et al., 2001).

Toutefois, les cellules tumorales peuvent sécréter des molécules MICA/B solubles dans le milieu, ce qui constitue pour elles un moyen d'échappement à l'immunosurveillance. En effet, ces ligands solubles vont diminuer l'expression de NKG2D à la surface des cellules NK et des cellules T, ce qui réduit fortement leur capacité cytotoxique (Groh et al., 2002).

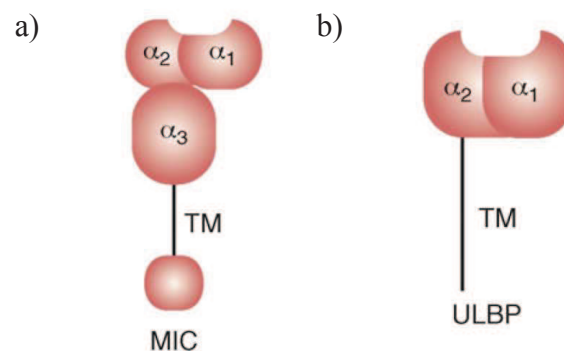


Fig. 11 : Représentation schématique des ligands de NKG2D chez l'Homme. En a, les ligands de la famille MIC et en b, les ligands de la famille ULBP (Gonzalez et al., 2008)

La famille des protéines ULBP (pour UL-16 Binding Proteins) est composée de 5 membres (1-5). Ce sont également des membres distants de la famille du MHC de classe I mais n'expriment pas le domaine α_3 (Fig. 11). Ces protéines partagent 50% de similarité entre elles

et 25% avec les protéines du MHC I classiques et MICA/B. ULBP 1-3 sont ancrés dans la membrane par une séquence GPI (glycosylphosphatidylinositol), alors que ULBP 4 et 5 sont des protéines transmembranaires.

Ces ligands sont surexprimés dans les cancers du colon ou de l'estomac par exemple, alors qu'ils sont sous exprimés dans les cancers rénaux (Cosman et al., 2001).

Leur engagement avec NKG2D permet de surpasser les signaux inhibiteurs induits par le MHC de classe I. En effet, les cellules Daudi (qui n'expriment pas le MHC de classe I) sont des cibles pour les cellules NK. En transfectant ces cellules avec de la β_2 -microglobuline, elles peuvent dès lors exprimer le MHC de classe I et échappent à l'action cytotoxique des cellules NK. Si ensuite elles sont transfectées avec des ULBP, ces cellules redeviennent des cibles pour les cellules NK (Cosman et al., 2001).

F. Les lymphocytes TCR $\gamma\delta$

Les cellules TCR $\gamma\delta$ positives sont des lymphocytes T qui diffèrent des cellules T classiques par la composition des chaînes de leur TCR. En effet, ce récepteur est composé des sous-unités α et β dans le cas des cellules T classiques et des sous-unités γ et δ pour les lymphocytes TCR $\gamma\delta$. Ils constituent 1 à 5% des lymphocytes totaux circulants.

Ils ont une morphologie de larges lymphocytes granulaires, suggérant qu'ils exercent des fonctions cytolytiques. En effet, après activation par de l'IL-2 pendant 3 jours de culture, ils sont capables de lyser des cellules de mélanome fraîches (Grossi et al., 1992).

Ces cellules expriment toutes le CD3 à leur surface. Plus de la moitié d'entre elles expriment le CD8, mais dans plus de 95% des cas, elles sont négatives pour le CD4 (Groh et al., 1989).

Les gènes des chaînes du TCR sont, comme ceux des chaînes $\alpha\beta$, composés de régions variables V, de régions constantes C, de régions de jonctions J et, excepté la chaîne γ , de régions de diversités D. Grâce à un épissage alternatif lors de la traduction des gènes, la diversité du TCR est assurée, permettant ainsi la reconnaissance de plusieurs antigènes pour revue. Toutefois, 50 à 90% des lymphocytes TCR $\gamma\delta$ circulants expriment le gène V δ 2 qui est fréquemment associé à la chaîne V γ 9. Ils ont la capacité d'être activés par des bactéries et parasites en reconnaissant des antigènes non-peptidiques phosphorylés issus de la biosynthèse des isoprénoïdes par les bactéries (phosphoantigènes). Alors que les lymphocytes $\gamma\delta$ intraépithéliaux de l'intestin expriment majoritairement la chaîne V δ 1 qui peut-être associée à

différents V γ . Ces lymphocytes $\gamma\delta$ expriment tout comme les cellules NK le récepteur NKG2D et pourront donc reconnaître des récepteurs induits par le stress comme MICA, MICB et ULBP (Kabelitz et al., 2007). Elles expriment également les récepteurs KIR et sont également soumises à une balance entre signaux activateurs et inhibiteurs.

OBJECTIFS ET PLAN DE TRAVAIL

Notre travail s'inscrit dans un projet de recherche visant à déterminer le rôle de l'immunité innée dans les lésions du col de l'utérus associées au HPV et plus particulièrement au rôle des cellules NK et TCR $\gamma\delta$. Nous nous sommes intéressés à ces cellules car la littérature décrit un rôle important de ces cellules dans la réponse anti-tumorale et anti-virale.

Dans une première approche, nous avons voulu étudier ces populations lymphocytaires au sein de lésions cervicales au moyen de nouveaux marqueurs, permettant une meilleure caractérisation de ceux-ci.

Notre second objectif concerne l'effet prolifératif des VLP d'HPV16 sur les cellules NK. Des résultats antérieurs montrent une prolifération induite par ces VLP. Afin de pouvoir disposer d'un test permettant de différencier les cellules NK qui prolifèrent en présence de VLP, nous avons mis au point le test de prolifération au CFSE (CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester) à un petit nombre de cellules et appliqué celui-ci à des PBMC couplé à un marquage des cellules NK ou à des NK triées ; car ce test permet un marquage des cellules. On pourra donc déterminer quelle population cellulaire au sein de la co-culture entre en prolifération. Les PBMC étaient marqués de façon à pouvoir détecter les cellules NK au sein de la population lymphocytaire.

Enfin, comme le microenvironnement tumoral peut agir sur l'expression des ligands de NKG2D, un récepteur activateur commun aux cellules NK et TCR $\gamma\delta$, nous avons tenté de déterminer si la cytokine immunosuppressive TGF β 1 pouvait moduler l'expression de MICA à la surface de lignées cellulaires transformées par HPV ou non (cellules de type épithélial issues de carcinomes cervicaux). Pour ce faire, nous avons d'abord reproduit les résultats obtenus sur l'expression de MICA par ces lignées. Ensuite, nous avons étudié cette expression sur les différentes lignées après 7 jours de culture en présence de diverses concentrations en TGF β 1.

MATERIEL ET METHODES

A. Matériel.

1. Milieu de culture

- Milieu RPMI 1640 complet : Une bouteille de 500 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, Paisley, Grande-Bretagne) est complétée avec 10% de sérum de veau foetal (FCS) (Gibco) décomplémenté, 1% de pénicilline-streptomycine (Gibco – 10^4 µg/ml), 1% de sodium pyruvate (Gibco – 100mM) et 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco – 100x).
- Milieu DMEM complet : Une bouteille de 500 ml de milieu DMEM (Gibco-Invitrogen) est complétée avec 10% de sérum de veau foetal (Gibco) décomplémenté, 1% de pénicilline-streptomycine (Gibco – 10^4 µg/ml), 1% de sodium pyruvate (Gibco – 100mM) et 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco – 100x).

2. Solutions

- PBS 10x : Peser et mettre dans un berlin de 5 litres 21,5g (27mM) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, St Louis, Etats-Unis), 74g (104,2mM) de Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich) et 350g (1,21M) de NaCl (Sigma-Aldrich). Amener à 5 litres avec de l'eau déminéralisée.
- PBS : Mettre 50ml de PBS 10x dans 450ml d'eau déminéralisée. A l'aide du pHmètre, ajuster le pH à 7,4. Si la solution doit être stérile, elle sera filtrée sur une membrane avec des pores $< 0,22$ µm
- PBS BSA 5% : Dans un Falcon de 50 ml, mettre 2,5g de BSA et amener à 50 ml avec du PBS. Mettre à pH 7,4.
- PBS FCS 5% : Dans un Falcon de 50 ml, mettre 2,5 ml de FCS et ajouter 47,5 ml de PBS stérile.

- Tampon pour le tri des cellules NK (PES) : Solution de PBS avec 2% de sérum fœtal bovin et 1mM d'EDTA. Ajuster le pH à 7,4 et filtrer la solution sur une membrane avec des pores < 0,22 µm afin de la stériliser.
- PAF 4% : Agiter et chauffer à 50°C le tampon phosphate (25 ml de solution NaH₂PO₄ 2H₂O 0,4M et 112,5 ml de solution Na₂HPO₄ amené à 1 litre avec de l'eau déminéralisée). Y ajouter 4% (4g/100ml) de paraformaldéhyde (Merck, Darmstadt, Allemagne). Laisser agiter jusqu'à ce que la solution devienne limpide (± 1h). Filtre sur une membrane avec des pores < 45 µm.
- PAF 1% : Diluer 10ml de PAF 4% dans 30ml de PBS. Ajuster à pH 7,4.
- Trypsine-EDTA 0,5% (Gibco)
- CFSE : CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (C34554) (Molecular Probes-Invitrogen). Ce kit comprend 10 fioles de CellTrace™ CFSE (composant A) contenant chacune 50µg de poudre lyophilisée, 1 fiole de 0,5ml dimethylsulfoxyde (DMSO) de haute qualité. Afin de préparer la solution stock de 5mM, ajouter 10µl de DMSO dans une fiole de CellTrace™ CFSE. Cette solution est stockée à -20°C en aliquot de 5µl.
- PHA : La PHA vient de la firme Roche (ROCHE Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Elle est reçue dans une ampoule contenant 5mg de poudre lyophilisée et est diluée dans 5 ml d'eau stérile afin d'obtenir une concentration stock de 1 mg/ml qui est conservée à -20°C. La solution stock est décongelée avant utilisation et est diluée dans du milieu RPMI complet à la concentration désirée.

3. Cytokines

- hIL-2

L'IL-2 recombinante humaine utilisée provient de la firme Roche (ROCHE Diagnostics). Elle est reçue à une concentration de 5µg / ml, soit 10.000U / ml et est stockée à -80°C.

- TGF-β1

Le TGF-β1 recombinant humain vient de la firme Peprotech (PeproTech EC Ltd., London, Grande-Bretagne) et est produit à partir de cellules d'ovaire d'hamster de Chine. Au départ, il est sous forme de poudre lyophilisée qui est diluée dans 100µl d'eau ultra-pure ; la concentration est alors de 5µg/100µl. Cette solution est conservée à -20°C comme solution

stock. Cette solution est alors diluée une deuxième fois dans du milieu DMEM complet afin d'obtenir une concentration finale de 1µg/ml.

4. Pseudo particules virales ou VLP (Virus Like Particules)

Les VLP de HPV sont produites au laboratoire par Virginie Renoux grâce à un système baculovirus-cellules d'insecte Sf9 (cellules d'ovaire de *Spodoptera frugiperda*) (Kawana et al., 1998). Elles sont constituées uniquement de la protéine L1. Les VLP sont resuspendues dans une solution de NaCl 0,15M. Au cours de ce mémoire, des VLP d'HPV 16 sont utilisées. Les VLP sont dosées par Western Blot et leur structure vérifiée par microscopie électronique.

5. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées au cours de ce travail sont les suivantes :

- CaSki : Lignée de kératinocytes issus d'une métastase intestinale d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus HPV16 + (300 à 600 copies par cellule) (Pattillo et al., 1977) (Yee et al., 1985).
- SiHa : Lignée de kératinocytes issus d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus. Elles sont HPV16 + (1 à 2 copies par cellule) (Yee et al., 1985) (Baker et al., 1987)
- C33a : Lignée de kératinocytes issus de biopsie de cancer du col de l'utérus. Cette lignée montre un caryotype hypodiploïde. Une instabilité caryotypique est observée au cours de passages successifs. Cette lignée est négative pour HPV (Auersperg, 1964) (Yee et al., 1985).

B. Méthodes.

1. Culture cellulaire

1.1. Culture des cellules CaSki, SiHa et C33a

Ces lignées sont mises en culture dans du milieu DMEM complet dans une boîte de culture T25. Une fois que la confluence atteint 80%, les cellules doivent être passées. Pour cela, le milieu de culture est aspiré, les cellules lavées dans du PBS-EDTA 5% pendant quelques secondes afin d'éliminer tout le milieu ; et le PBS est aspiré. Ensuite, 1ml de trypsine est ajouté sur les cellules et celles-ci sont mises quelques minutes à 37°C afin de favoriser l'action de la trypsine. Une fois les cellules détachées, 7ml de milieu DMEM complet sont ajoutés afin de neutraliser l'action de la trypsine. Les cellules sont mises à centrifuger à 447xg à 4°C pendant 7min, le surnageant est aspiré et le culot repris dans 1ml de milieu DMEM complet. 100µl ou 200µl de la solution cellulaire sont mises en culture dans une nouvelle T25 avec 6ml de milieu DMEM complet.

1.2. Mise en culture des lignées avec le TGF-β1

Cinquante mille cellules sont mises en culture dans 3ml de DMEM complet en plaque 6 puits. Le jour suivant, diverses concentrations de TGF-β1 sont ajoutées : un puits contrôle (sans TGF-β1), un puits avec 0,2 ng/ml de TGF-β1, un avec 1 ng/ml et un avec 10 ng/ml. Les puits sont réalisés en duplicate.

2. PBMC et cellules NK

2.1. Séparation des PBMC à partir d'un buffy coat.

Les buffy coat sont délivrés par le centre de transfusion de Liège. Ils sont constitués de sang non coagulé et contiennent les globules blancs (lymphocytes, monocytes et granulocytes) enrichis, des globules rouges, des plaquettes et du plasma. Les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) sont séparés des autres composants par centrifugation de 30 min à 447xg sans frein sur un gradient de lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norvège). Une deuxième centrifugation sur gradient d'optiprep (Axis-Shield) est ensuite réalisée si il reste beaucoup de plaquettes avec les PBMC. Pour ce faire, le sang est d'abord dilué dans un volume égal de milieu RPMI seul. Ensuite, il est déposé délicatement sur le lymphoprep dans les proportions

1/3 de lymphoprep – 2/3 de sang dilué. Une centrifugation de 30 min sans frein est réalisée à la vitesse de 447xg à 20°C. On observe alors une séparation des différentes phases : dans le fond, les globules rouges ; l’anneau de PBMC au milieu et le plasma dans la partie supérieure (Fig. M1).

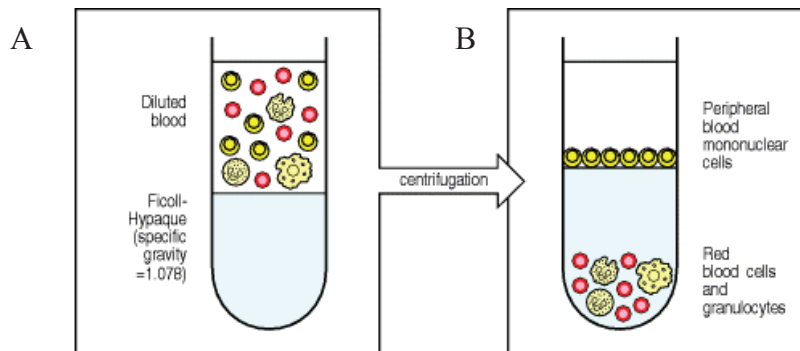


Fig. M1: Représentation schématique de la séparation des différentes phases d’un buffy coat. A Tube avant centrifugation. B Tube après centrifugation. (Janeway C.A., 2001)

L’anneau de PBMC est récupéré à l’aide d’une pipette de 5ml. Ensuite, les cellules sont lavées dans du RPMI et centrifugées 10 min à 20°C à la vitesse de 185xg afin de se débarrasser d’un maximum de plaquettes. On observe ensuite les cellules au microscope afin de voir si il reste beaucoup de plaquettes contaminantes. Dans l’affirmative, les cellules sont ensuite déposées délicatement sur le gradient d’optiprep dans les proportions 1 : 1 et mis à la centrifugeuse 15 min sans frein à la vitesse de 386xg à 20°C. Les PBMC forment un culot dans le fond, les plaquettes étant restées en suspension dans l’optiprep. Le surnageant est aspiré et les cellules resuspendues dans 5 ml de milieu RPMI complet.

2.2. Mise en culture des PBMC avec et sans IL-2

Dix millions de PBMC sont mis en culture dans une boîte de culture T25 avec 10 ml de milieu RPMI complet.

Une des deux boîtes sert de contrôle. Dans l’autre, 500U/ml d’IL-2 sont ajoutées et cette opération renouvelée au jour 4.

2.3. Tri négatif des cellules NK

Les cellules NK constituent 5 à 10% des lymphocytes du sang périphérique. Il est donc nécessaire de récupérer les cellules d’intérêt venant des PBMC et d’éliminer les monocytes et

les lymphocytes B et T afin d'étudier ces cellules. Pour ce faire, on sélectionne nos cellules d'intérêt avec un kit MACS (Magnetic Activated Cell Sorter). Cette séparation est basée sur des anticorps couplés à des microbilles magnétiques qui seront capturées dans le champ magnétique d'un aimant. Comme il s'agit d'un tri négatif, on utilise un cocktail d'anticorps qui reconnaîtra toutes les cellules présentes sauf les cellules NK. De cette manière, seules les cellules NK passeront à travers la colonne et toutes les autres seront retenues par l'aimant.

Le kit utilisé est le kit EasySep[®] Human NK Cell Enrichment Kit de chez StemCell (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada)

Cinquante millions de PBMC sont resuspendus dans 1 ml de tampon PES et placés dans un tube polystyrène de 5ml. Cinquante µl/ml du cocktail d'anticorps sont ajoutés, puis le tube est mélangé et laissé à incuber pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, 100 µl/ml de la solution de microbilles sont ajoutés avant d'agiter le tube et de laisser incuber 5 min à température ambiante. La suspension est ensuite amenée à 2,5 ml en ajoutant du tampon PES et le tube sera alors placé dans l'aimant pendant 2,5 min. Après, tout en laissant le tube dans l'aimant, il est retourné délicatement afin de récupérer la fraction désirée dans un nouveau tube.

3. Test de prolifération des cellules NK en co-culture avec des VLP-HPV.

Le CFDA-SE est une molécule qui peut rentrer passivement dans les cellules. Une fois internalisée, les estérases coupent un groupement acétyl qui devient alors du CFSE et peut se fixer à des protéines cellulaires. Lorsqu'il est fixé à des protéines qui ne sortent pas de la cellule, celui-ci restera indéfiniment à l'intérieur (Fig. M2). Au cours des divisions cellulaires, la moitié de CFSE est perdue. La fluorescence diminuera donc de moitié à chaque division, ce qui permettra de rendre compte du nombre de cellules en division ainsi que le nombre de générations (Quah et al., 2007).

Ce test a déjà été effectué sur un grand nombre de cellules, mais nous n'obtenons pas beaucoup de NK d'un buffy coat. Il a donc fallu adapter cette technique à un petit nombre cellulaire et déterminer la concentration optimale de CFSE à utiliser pour marquer nos cellules.

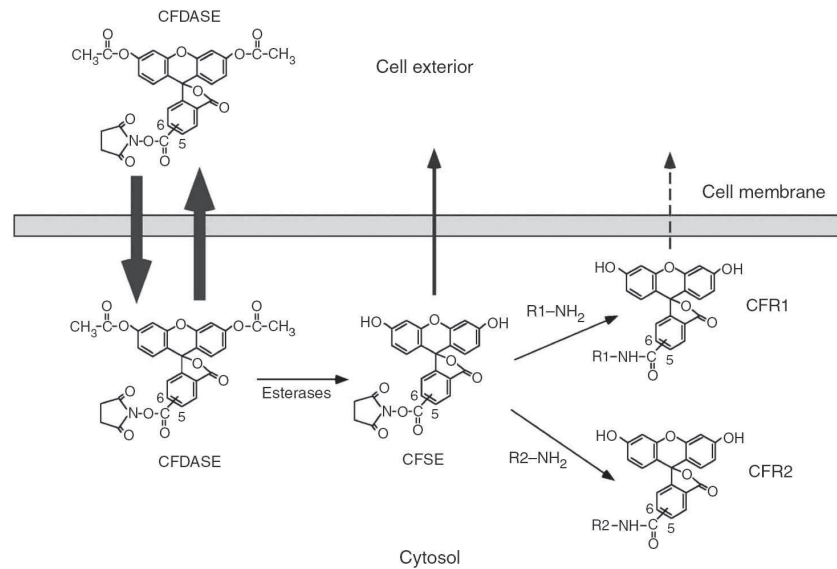


Fig. M2 : Représentation schématique de l'incorporation ou non du CFSE dans la cellule.

Note : l'acronyme CFSE est généralement utilisé pour décrire le réactif et la procédure de marquage.

Un test de prolifération au CFSE a été réalisé afin de voir si les VLP-HPV induisent la prolifération des cellules NK. Cette expérience est réalisée en parallèle avec des PBMC. Diverses conditions sont réalisées : une plaque avec des cellules marquées au CFSE et une avec des cellules non marquées. De plus, sur chaque plaque, une condition contrôle, une condition PHA 1µg/ml (contrôle positif), une condition IL-2 (500U/ml, contrôle positif) et une condition VLP HPV 16 5µg/ml sont réalisées.

Trois millions de cellules sont mises dans un Falcon de 15ml qui est ensuite rempli de PBS FCS 5% et mis à centrifuger 10 min à 447xg à 20°C. Le surnageant est aspiré et le culot repris dans 5 ml de PBS FCS 5% afin d'obtenir une concentration finale en CFSE de 1 µM. La suspension cellulaire est alors transvasée dans un nouveau Falcon sec en veillant à ne pas mouiller les bords du Falcon. Le Falcon est couché délicatement afin que le PBS FCS 5% et les cellules restent dans le fond du Falcon. Une goutte de 110µl de PBS est déposée à l'entrée du Falcon dans laquelle 1,1µl de CFSE 5mM est ajouté. Le Falcon est alors refermé délicatement et remis droit d'un coup sec avant d'être vortexé et mis à incuber 4 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Un premier lavage est réalisé en remplissant le Falcon de PBS FCS 5% et mis à la centrifugeuse 10 min à 447xg à 20°C. Le surnageant est aspiré, le Falcon à nouveau rempli de PBS FCS 5% et mis à 37°C pendant 15 min. Deux lavages successifs sont réalisés suivi d'un comptage au bleu trypan afin de s'assurer que le nombre exact de cellules seront mises en culture. La quantité de milieu RPMI complet adéquate est ajoutée de façon à avoir 10⁵ cellules dans 150µl de milieu. Cinquante µl de milieu RPMI complet, de milieu RPMI complet + PHA 4µg/ml, de milieu RPMI + 100U IL-2

ou de milieu RPMI complet + 1µg de VLP-HPV 16 sont ajoutés suivant les conditions. Chaque condition est réalisée en duplicate.

La plaque de cellules non marquées est réalisée de la même manière.

Les cultures sont analysées au jour 3, 5 et 7 au FACS.

4. Phénotype

4.1. Analyse des marqueurs de surface par cytométrie en flux.

La cytométrie en flux est un appareil couramment utilisé en immunologie qui permet d'analyser de façon rigoureuse et rapide les caractéristiques de chaque cellule en suspension. Pour cela, les cellules sont marquées à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes et dirigés contre les protéines cellulaires. Le cytomètre utilisé est le FACS Canto II (Becton Dickinson, Erembodegen, Belgique). Les cellules en suspension sont prélevées par le cytomètre et propulsée dans un jet d'eau saline microscopique (70µm) contenu dans un liquide de gaine. Les cellules passeront alors dans le faisceau lumineux des différents lasers et deux phénomènes se manifestent alors simultanément : la diffusion lumineuse et une émission de fluorescence dépendant du fluorochrome utilisé.

Un photodétecteur capte la lumière de diffusion axiale diffractée par la cellule et d'intensité proportionnelle à l'aire de section de la cellule. Cette lumière est détectée en aval d'une barre d'arrêt. C'est le FSC (Forward scatter) qui permet de rendre compte de la taille des cellules.

Des photomultiplicateurs captent la lumière de diffusion orthogonale réfractée et la fluorescence émise par la cellule. Ils permettent d'amplifier le signal lumineux obtenu.

La lumière de diffusion orthogonale réfractée est le SSC (Side scatter). Son intensité augmente avec l'hétérogénéité des constituants intracellulaires et avec la granulosité des membranes (Fig. M3).

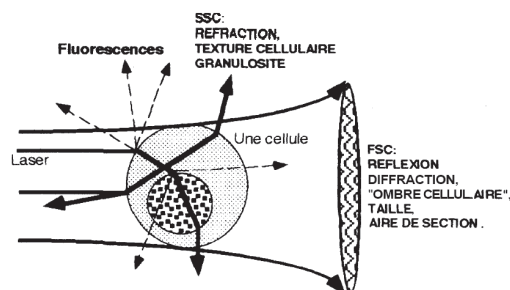


Fig. M3 : Diffusion axiale et orthogonale suite au passage de la cellule dans un laser (cours de Roland Greimers sur la cytométrie en flux, 2008).

Par l'analyse de la lumière dans ces deux directions, on peut donc, sans l'aide de fluorochromes, discriminer des populations cellulaires de taille différente et de structure interne différente comme par exemple les lymphocytes, monocytes et granulocytes (Fig. M4).

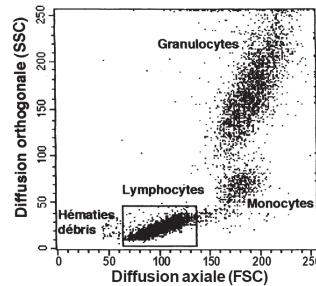


Fig. M4 : scatter FSC/SSC sur du sang complet (cours de Roland Greimers sur la cytométrie en flux, 2008) (Greimers, 2008)

On pourra également différencier les cellules vivantes des cellules mortes. En effet, les cellules mortes paraîtront de plus petite taille et plus granuleuses.

La fluorescence émise par les fluorochromes est proportionnelle à la concentration de ces derniers présents en surface ou à l'intérieur de la cellule. Plusieurs fluorochromes sont disponibles et sont caractérisés par un spectre d'émission de fluorescence propre. Les signaux lumineux passent ensuite par différents filtres avant d'atteindre leur détecteur, ce qui permet de discriminer les types d'impulsion correspondant aux différents fluorochromes (Fig. M5).

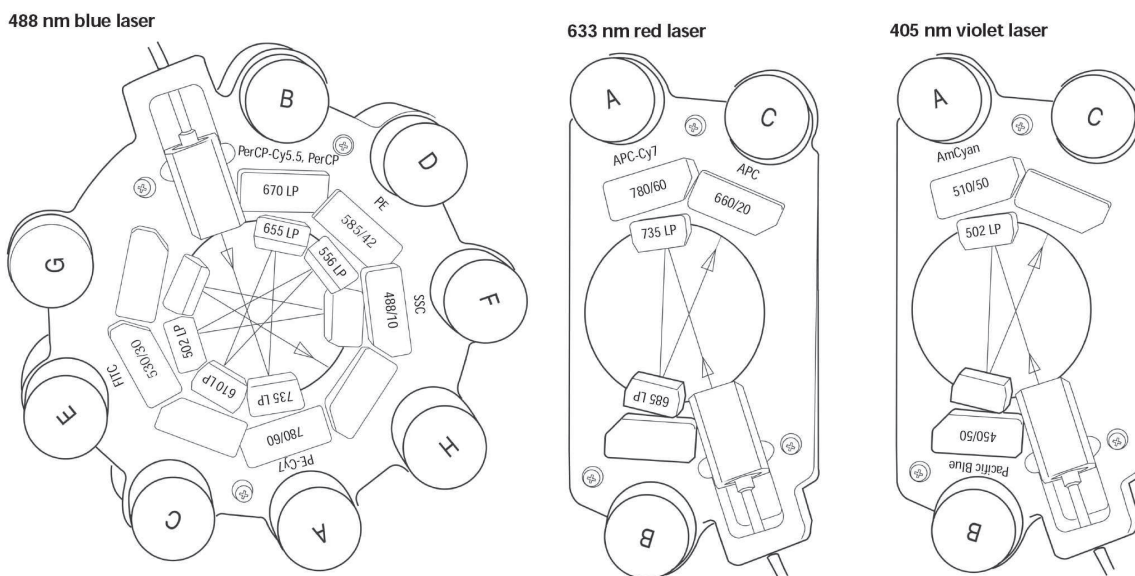


Fig. M5 : Schéma des détecteurs et filtres pour les 3 lasers du FACS Canto II (D'après le manuel d'utilisation du FACS Canto II).

Au cours de ce mémoire, 6 fluorochromes ont été utilisés.

- Le fluorochrome Pacific Blue (PB) dont la longueur d'onde d'excitation est de 405 nm et celle d'émission de 452 nm (bleu).
- Le fluorochrome Horizon V450 dont la longueur d'onde d'excitation est de 405 nm et celle d'émission de 448 nm (bleu).
- Le fluorochrome isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dont la longueur d'onde d'excitation est de 488 nm et celle d'émission de 520 nm (vert).
- Le fluorochrome phycoérythrine (PE) dont la longueur d'onde d'excitation est de 488 nm et celle d'émission de 578 nm (orange).
- Le fluorochrome composé d'un complexe naturel de peridinine et de chlorophylle (PerCP) dont la longueur d'onde d'excitation est de 488 nm et celle d'émission de 678 nm (rouge).
- Le fluorochrome allophycocyanine (APC) dont la longueur d'onde d'excitation est de 635 nm et celle d'émission de 660 nm (rouge).

Tous les signaux lumineux captés sont transmis à des détecteurs photoélectriques puis à un ordinateur qui mémorise toutes les données individuelles. Le programme utilisé pour l'analyse est le BD FACSDiva v6 (Becton Dickinson).

Avant de commencer à réaliser notre marquage sur nos cellules d'intérêt, nous avons mis au point les valeurs des PMT ainsi que les compensations entre les fluorochromes utilisés.

Pour ce faire des PBMC ont été marqués avec du CD8-FITC, CD56-PE, NKp46-APC, CD16-PB et du CD3-PerCP. Un tube contient les cellules non-marquées, chaque anticorps est mis seul sur les PBMC et enfin un tube avec les 5 anticorps.

En passant le PBS, on règle les PMT de façon à ce que la valeur de chaque fluorochrome soit comprise dans la première décade (valeur MIF entre 1 et 100).

Ensuite les tubes ne contenant qu'un seul anticorps sont passés et le programme calcule les différentes compensations à réaliser entre les fluorochromes.

4.2. Phénotype sur les PBMC

Les anticorps utilisés pour caractériser les cellules lymphocytaires sont tous couplés à un fluorochrome sauf un. Pour ce-dernier, on utilise un anticorps secondaire qui est un anticorps de chèvre dirigé contre les anticorps de souris (GAM pour Goat Anti Mouse) et couplé à du PE.

Liste des anticorps utilisés pour le marquage lymphocytaire :

Anticorps	Fluorochrome	Firme	Quantité utilisée
Anti-NKp46	APC	Miltenyi Biotec	2µl
Anti-CD3	PerCP	BD Bioscience	10µl
Anti-CD3	FITC	BD Bioscience	5µl
Anti-CD8	FITC	BD Bioscience	5µl
Anti-CD8	PerCP	BD Bioscience	10µl
Anti-CD69	PE	BD Bioscience	5µl
Anti-CD16	PB	BD Pharmingen	3µl
Anti-CD16	Horizon	BD Pharmingen	3µl
Anti CD56	PE	Dako	5µl
Anti-NKG2D	APC	BD Pharmingen	10µl
Anti-CD25	PE	BD Bioscience	5µl
Anti-TCRγδ	FITC	BD Bioscience	5µl
GAM	PE	Dako	3µl
NKp44	/	*	10µl

*L'anticorps a été généreusement fourni par le Docteur Marco Clonna de St Louis aux Etats-Unis.

La réalisation du phénotype est effectuée le jour de la séparation des PBMC et après 7 jours de culture avec ou sans IL-2 (500U/ml).

Au J0, 3 différents cocktails d'anticorps sont utilisés :

Mix 1 : NKp46 APC, CD3 PerCP (ou FITC), CD8 FITC (ou PerCP) et CD69 PE.

Mix 2 : NKp46 APC, CD16 PB (ou Horizon), CD56 PE et CD3 PerCP (ou FITC).

Mix 3 : NKG2D APC, CD3 PerCP, CD16 PB (ou Horizon), CD25 PE et TCRγδ FITC.

Au J7, les 3 mêmes cocktails sont utilisés avec en plus un tube pour le GAM PE seul et un tube pour le NKp44 + GAM PE.

Pour ce faire, 2×10^5 PBMC sont mis en tube de comptage et resuspendus dans 20 μ l de PBS BSA 5%. Les anticorps sont ajoutés et le tout est mis à incuber sur glace pendant 30 min à l'abri de la lumière. Ensuite, un lavage avec 700 μ l de PBS BSA 5% est réalisé suivi d'une centrifugation de 10 min à 447xg à 4°C. Le surnageant est alors aspiré et le culot resuspendu dans 300 μ l de PAF 1% servant à fixer les cellules.

Dans le cas d'un marquage secondaire, après la centrifugation, le culot est repris dans 20 μ l de PBS BSA 5% et l'anticorps secondaire est ajouté. Viens ensuite une nouvelle incubation de 30 min sur glace à l'abri de la lumière, un lavage avec 700 μ l de PBS BSA 5% et une centrifugation de 10 min à 447xg à 4°C. Le surnageant est aspiré et le culot repris dans 300 μ l de PAF 1%.

Le même protocole est utilisé pour marquer les PBMC après co-culture avec les VLP d'HPV16 où l'anticorps utilisé est le NKp46-APC.

4.3. Marquage MICA sur lignées cellulaires.

Anticorps utilisés pour le marquage cellulaire :

Anticorps	Fluorochrome	Firme	Quantité utilisée
BAM 195	/	*	10 μ l
GAM	PE	Dako	3 μ l
MICA	PE	Santa Cruz	4 μ l

*L'anticorps BAM 195 vient de liquide d'ascite et est fourni par Daniela Pende de Gêne en Italie.

Le marquage est effectué de la même manière que pour les PBMC.

RESULTATS

A. Caractérisation des cellules NK et TCR $\gamma\delta$

1. Dans le sang périphérique

Récemment, de nouveaux marqueurs de surface ont été décrits pour les cellules NK. Certains d'entre eux sont décrits comme étant spécifiques des cellules NK tel que les NCR. D'autres ont permis une meilleure caractérisation fonctionnelle des cellules NK comme le récepteur NKG2D. Ce dernier est également exprimé à la surface d'autres types de cellules cytotoxiques. Ces nouveaux marqueurs permettent de mieux caractériser les cellules NK. Dans une première étape, nous avons analysé les cellules NK ainsi que les lymphocytes TCR $\gamma\delta$ présents dans le sang.

Les marquages utilisant 4 à 5 couleurs nécessitent une compensation électronique pour supprimer les phénomènes de chevauchement des spectres d'émission des fluorochromes. Cette compensation peut-être calculée automatiquement en réalisant des simples marquages pour chaque fluorochrome. Cependant, nous avons constaté des erreurs de compensation que nous avons corrigées manuellement. En effet, la figure R1 illustre les problèmes de surcompensation entre les fluorochromes Pacific Blue et PerCP (fig. 1A-B) et de sous compensation entre les fluorochromes APC et PerCP (Fig. 1C-D).

Après cette mise au point, nous avons analysé les cellules NK et TCR $\gamma\delta$ sur des donneurs sains.

Généralement, les cellules NK humaines sont détectées grâce à la présence des marqueurs CD16 et CD56 en l'absence de CD3. Nous avons observé que $7,9\% \pm 2,4$ des lymphocytes du sang répondent à ces caractéristiques (fig.2). Ces cellules sont constituées de 2 populations, l'une exprimant fortement le CD56 (CD56^{bright}) et l'autre l'exprimant plus faiblement (CD56^{dim}). Nous avons observé $6\% \pm 1,2$ de cellules NK CD56^{bright} et $77,4\% \pm 2,9$ de cellules NK CD56^{dim}.

NKp46 est considéré comme marqueur spécifique des cellules NK de mammifères. Nous avons donc comparé les résultats obtenus avec ce marqueur par rapport à ceux obtenus avec le marquage classique. Avec ce marqueur nous avons détecté $8\% \pm 1,3$ cellules comme étant des

cellules NK au sein des lymphocytes. La proportion de cellules ainsi détectées est similaire à celle obtenue avec le marquage classique (Fig. R2).

Les cellules positives pour NKp46 n'ont jamais été également positives pour le CD3 (Fig. 1D). Pour comparaison, la figure R2 reprend aussi le pourcentage des autres populations lymphocytaires ayant un potentiel cytotoxique tel que les cellules TCR $\gamma\delta$ (3,8% \pm 1,5) et les lymphocytes T cytolytiques CD8+ (19,2% \pm 2,9).

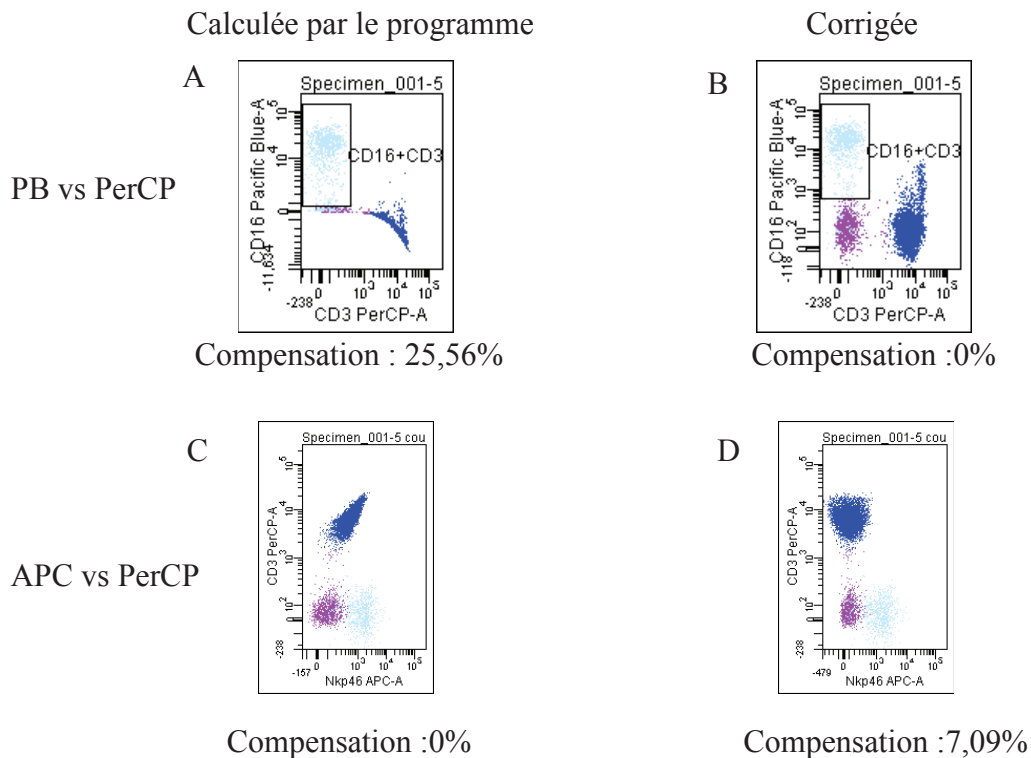


Fig. R1 : Correction des calculs de compensation effectués par FACSDiva 6.0.

A-B marquage CD16 PB vs CD3 PerCP. C-D marquage CD3 PerCP vs NKp46 APC. Avec compensation automatique (A et C) ou corrigée manuellement (B et D).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux différentes populations au sein des cellules NKp46+ (Fig. R3). Nous avons montré que 93,46% \pm 1,00 des cellules NKp46 sont également positives pour le CD16, 93,56% \pm 1,57 pour le CD56, 6,68% \pm 1,91 sont CD56^{bright}, 39,44% \pm 5,91 sont CD8 positives. Pour les cellules NKp46+ CD8+, on a également constaté que ces cellules exprimaient faiblement le CD8 et ne faisaient donc pas partie des cellules CD8^{bright} (Fig. R4). Comme il a été dit plus haut, aucune cellule NKp46 n'a montré de co-expression de CD3 (donnée non illustrée). Les cellules n'étant pas activées, seul 0,46% \pm 0,34 montrent une expression du marqueur d'activation CD69.

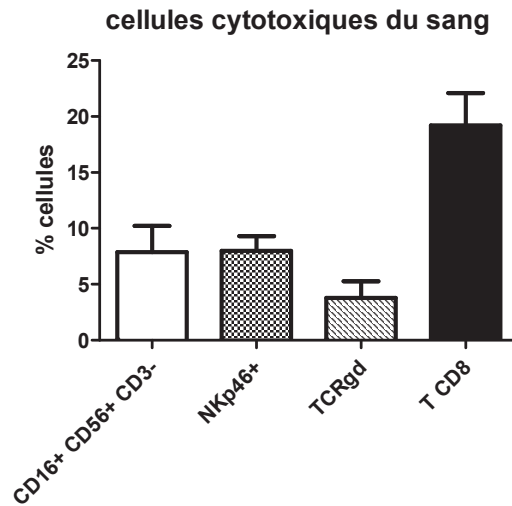


Fig. R2 : Analyse des cellules cytotoxiques du sang. Marquage réalisé sur des PBMC frais issus d'un buffy coat. (n = 5 pour CD16+ CD56+ CD3-, n = 8 pour TCR $\gamma\delta$ et n = 9 pour NKp46 et T CD8) (valeurs exprimées en moyenne de pourcentage des cellules \pm l'erreur standard).

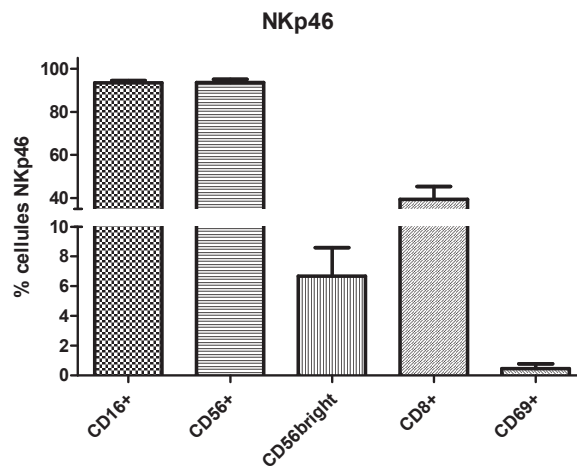


Fig. R3 : Etude des différentes populations de cellules NKp46+ dans le sang. Marquage réalisé sur des PBMC fraîchement isolé d'un buffy coat (n=5) (valeurs exprimées en moyenne de pourcentage des cellules \pm l'erreur standard).

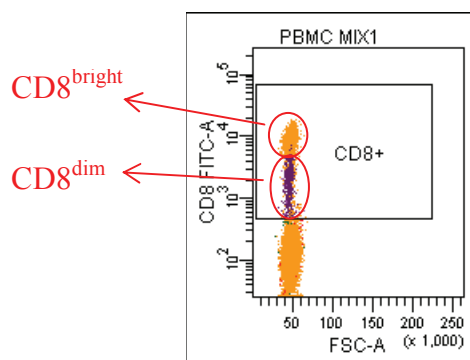


Fig. R4 : Niveau d'expression du CD8 par les cellules NKp46 CD8+

Les cellules NKp46 CD8+ (en mauve) se situent toutes dans les cellules plus faiblement positives pour CD8 (CD8^{dim})

Les lymphocytes TCR $\gamma\delta$ ont également été analysés (Fig. R5). Ainsi, on a pu montrer que ces lymphocytes sont bien positifs pour le CD3 (98,94% \pm 0,35). On remarque également que 57,31% \pm 13,70 des TCR $\gamma\delta$ portent le récepteur NKG2D. Généralement, les cellules TCR $\gamma\delta$ expriment faiblement le récepteur de faible affinité à l'IL-2, CD25. Parmi nos donneurs, un d'entre eux montrait une forte expression de CD25 (41,3%) suggérant qu'il souffrait peut-être d'une infection. Cette valeur a donc été exclue pour la réalisation des tests statistiques. Nous observons alors que seul 3,8% \pm 1,5 d'entre eux expriment le CD25. Nous avons également analysé l'expression du CD16 sur les lymphocytes TCR $\gamma\delta$ et constaté que 37,43% \pm 9,90 de ceux-ci sont positifs pour ce marqueur.

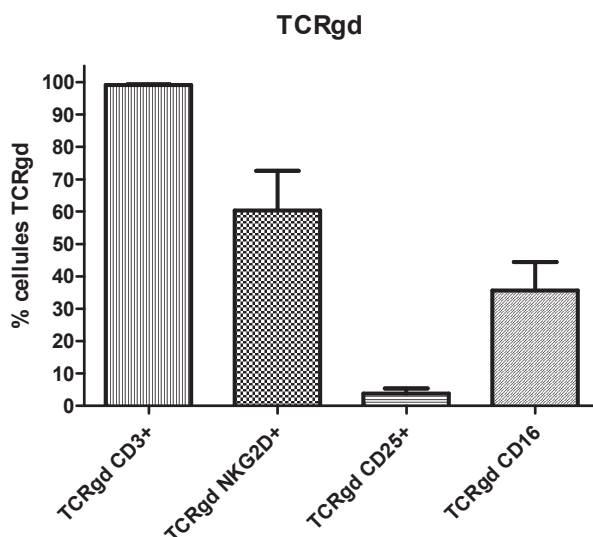


Fig. R5 : Etude des différentes populations de cellules TCR $\gamma\delta$ dans le sang.

Marquages réalisés sur PBMC fraîchement isolé d'un buffy coat. (n=5) (valeurs exprimées en moyenne de pourcentage des cellules \pm l'erreur standard).

2. Etude préliminaire des populations NK et TCR $\gamma\delta$ aux sein des lésions cervicales.

Après la caractérisation des cellules NK et TCR $\gamma\delta$ issues du sang, nous avons réalisé une étude préliminaire sur les cellules issues de biopsies cervicales. Ces cellules ont été obtenues soit à partir de l'épithélium ou du stroma et amplifiées après une culture en présence d'IL-2 (Jacobs et al., 2003). Ces cellules ont été congelées à -80°C. Nous avons réalisé notre étude sur 3 échantillons de cellules issues de lésions cervicales et sur 2 échantillons de cellules du stroma dont 1 était adjacent à un épithélium normal et l'autre à une lésion. Ces 2 échantillons venaient du même donneur.

Les cellules issues de l'épithélium sont principalement composées de lymphocytes T (99,69% \pm 0,07) dont la plupart sont des lymphocytes T cytotoxiques (84,07% \pm 14,06 des cellules totales). Un échantillon sur les trois montrait une grande infiltration de lymphocytes TCR $\gamma\delta$ (94,3%), ce qui explique l'écart-type obtenu pour ces cellules (33,63% \pm 30,38). On notera que cet échantillon contenait moins de cellules T cytotoxiques que les 2 autres. Toutefois, le fait qu'il en contienne toujours 56% suggère qu'une partie des lymphocytes TCR $\gamma\delta$ de ce patient sont CD8+. Ces échantillons contenaient moins de 1 % de cellules NK CD16+ CD56+ CD3- ou NKp46+ (Tableau R1).

	CD3+	CD3+ CD8+	CD16+ CD56+ CD3-	NKp46+	TCR $\gamma\delta$
Echantillon 1	99,8 99,9 99,8	96,5	0,1	0,5 0,5	6,3
Echantillon 2	99,7 99,8 99,9	99,7	0,1	0,1 0,1	0,3
Echantillon 3	99,4 99,5 99,4	56	0,1	0,2 0,2	94,3
Moyenne	99,7	84,1	0,1	0,3	33,6
Erreur standard	0,1	14,06	0	0,1	30,4

Tableau R1 : Quantification des lymphocytes cytotoxiques et des cellules NK présents dans les lésions cervicales. Certains anticorps étaient présents dans plusieurs cocktails permettant une analyse en duplicate (NKp46) ou triplicate (CD3).

Les cellules lymphocytaires issues de SIL du stroma montre une plus grande proportion de cellules NK (marquées classiquement ou avec NKp46), de cellules TCR $\gamma\delta$ et de lymphocytes CD8 par rapport au stroma de l'exocol normal (Fig. R7). Il faudra répéter cette expérience afin de confirmer les résultats.

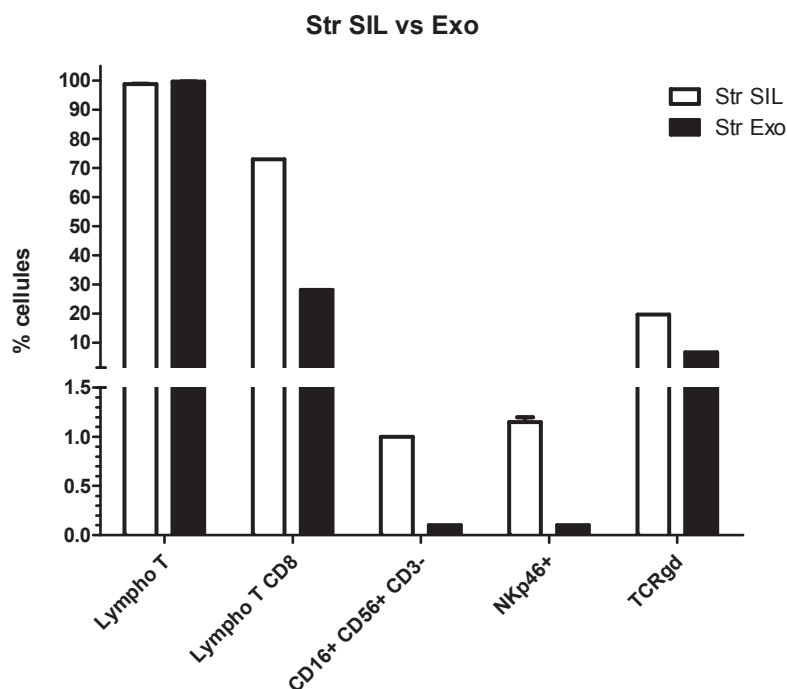


Fig. R7 : Analyse des lymphocytes issus du stroma avoisinant les SIL

Echantillons provenant du même patient. Str SIL correspond à du stroma avoisinant une lésion et Str Exo correspond à du stroma avoisinant de l'exocol normal. (n = 1)

Malgré la faible proportion de cellules NKp46+ dans les cellules issues de l'épithélium, nous avons caractérisé ces cellules et nous les avons comparées aux cellules issues de culture de PBMC en présence ou non d'IL-2 (Fig. R8).

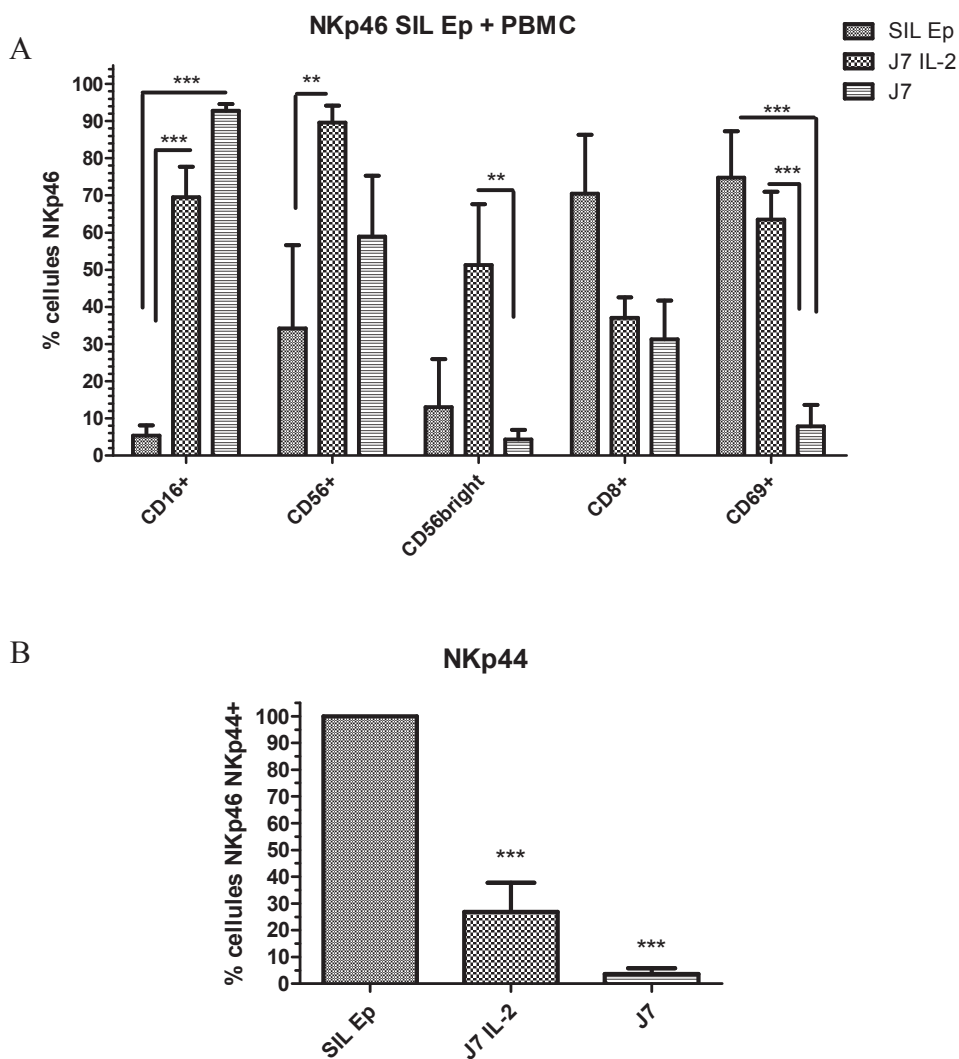


Fig. R8 : Caractérisation des lymphocytes NKp46+ infiltrant l'épithélium des SIL

SIL Ep : lymphocytes issus de biopsies de lésions de patients (n = 3). J7 + IL-2 : PBMC mis en culture dans du RPMI complet avec 500U/ml d'IL-2 pendant 7 jours (n = 5). J7 : PBMC mis en culture pendant 7 jours dans du milieu RPMI complet. (n = 5). En A, cellules NKp46 positives pour les différents marqueurs. En B, ratio cellules NKp44+ / NKp46+ (valeurs exprimées en moyenne de pourcentage des cellules \pm l'erreur standard ; ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$).

On peut constater que le marqueur d'activation CD69 est significativement plus élevé suite à la culture des PBMC avec de l'IL-2 montrant une activation induite par IL-2. (63,46% pour les PBMC cultivés avec de l'IL-2 contre 7,84% sans IL-2). Ce marqueur est également augmenté dans les lésions par rapport aux PBMC non activés (74,80% pour les lymphocytes des SIL contre 7,84% pour les PBMC non activés). On peut également remarquer que le pourcentage de cellules NKp46 CD56^{bright} augmente également de façon significative chez les PBMC activés (51,28 vs 4,36), mais pas dans les cultures issues de l'épithélium. Les cellules NK issues des lésions montrent une diminution significative de CD16 par rapport à celles issues des PBMC qu'ils soient activés ou non ainsi qu'une augmentation significative de

l'expression de NKp44 montrant qu'elles sont toutes positives pour ce marqueur et donc toutes activées. Le marqueur CD56 est significativement diminué à la surface des lymphocytes NKp46+ infiltrant la lésion par rapport aux lymphocytes activés (34,20% contre 89,6% respectivement).

L'expression de NKp44 est significativement plus élevée dans les cellules NKp46 issues de lésions cervicales par rapport aux PBMC mis en culture avec ou sans IL-2. Cependant, on n'a pas observé d'augmentation significative du marqueur NKp44 entre les PBMC activés ou non. On note toutefois une tendance à l'augmentation (26,83 avec IL-2 contre 3,73 sans).

Nous avons ensuite réalisé la même série de marquage sur les lymphocytes venant du stroma de biopsies. Nous avons comparé un échantillon d'une lésion contre un échantillon issu d'un exocol normal (Fig. R9).

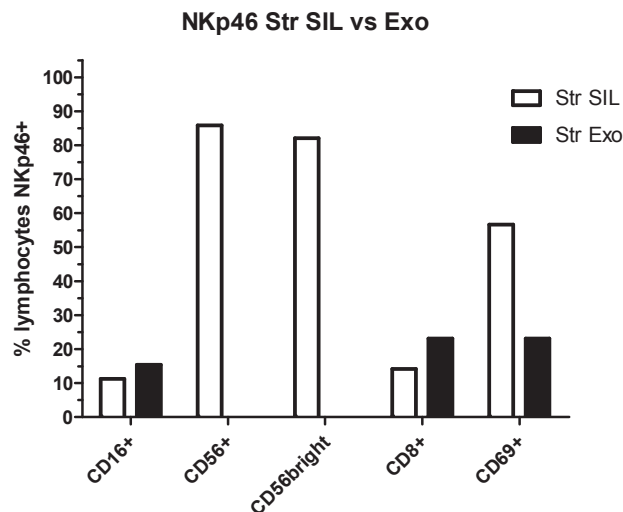


Fig. R9 : Caractérisation des lymphocytes NKp46+ infiltrant le stroma avoisinant les SIL
Cellules issues de biopsie du stroma cervical adjacent à une lésion (Str SIL) ou adjacent à un exocol normal (Str Exo) provenant de la même patiente (n = 1)

Cette expérience semble mettre en avant un recrutement des cellules NKp46 CD56+ du stroma situé autour d'une lésion et une augmentation de l'expression de CD69.

Le marqueur NKp44 a également été analysé et toutes les cellules NKp46 étaient positives qu'il y ait présence de lésions ou non (données non illustrées). Comme nous ne disposions que d'un échantillon, aucune étude statistique n'a été réalisée. Il conviendra donc de répéter ces expériences pour interpréter ces résultats.

Concernant les lymphocytes TCR $\gamma\delta$, nous nous sommes intéressés aux récepteurs CD16, NKG2D et au marqueur d'activation CD25 (Fig. R10).

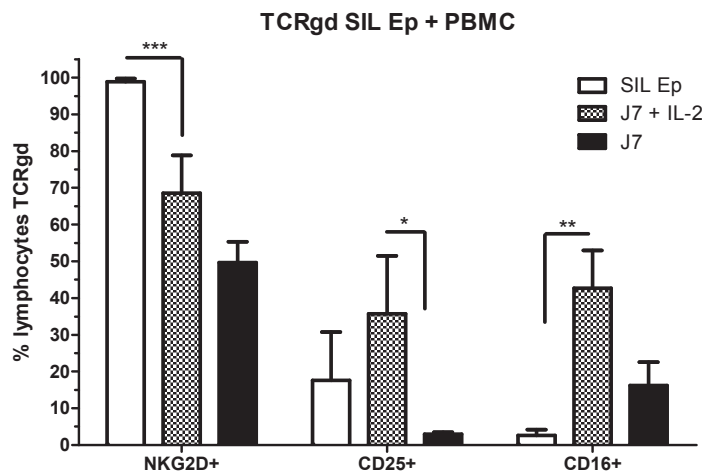


Fig. R10 : Caractérisation des lymphocytes TCR $\gamma\delta$ + infiltrant l'épithélium des SIL

SIL Ep : lymphocytes issus de biopsies de lésions de patients (n = 3). J7 + IL-2 : PBMC mis en culture dans du RPMI complet avec 500U/ml d'IL-2 pendant 7 jours (n = 5). J7 : PBMC mis en culture pendant 7 jours dans du milieu RPMI complet. (n = 5) (valeurs exprimées en moyenne de pourcentage des cellules \pm l'erreur standard ; * = p<0,05, ** = p<0,01 et *** = p<0,001).

Une augmentation significative de CD25 sur les lymphocytes cultivés en présence d'IL-2 montre que ceux-ci sont activés (35,76% avec IL-2 contre 2,96 sans). L'expression de ce marqueur reste modérée au sein des lymphocytes issus de la lésion (17,63%). Par contre, les cellules TCR $\gamma\delta$ expriment presque toutes le récepteur NKG2D (98,90%) lorsqu'ils sont issus de SIL alors que pour les cellules TCR $\gamma\delta$ issus de culture sans IL-2 seul la moitié (49,62%) l'expriment. Les cellules issues de lésions sont très rarement positives pour le TCR $\gamma\delta$ et le CD16 en même temps (seul 2,60 % sont concernées). Les cellules mises en culture avec de l'IL-2 semblent augmenter l'expression de CD16 par les cellules TCR $\gamma\delta$. Cette augmentation est significative par rapport aux cellules issues de lésions et une tendance à l'augmentation est observée par rapport aux cellules mises en culture sans IL-2.

Les résultats pour les cellules issues du stroma de biopsies cervicales est illustré dans la figure R11.

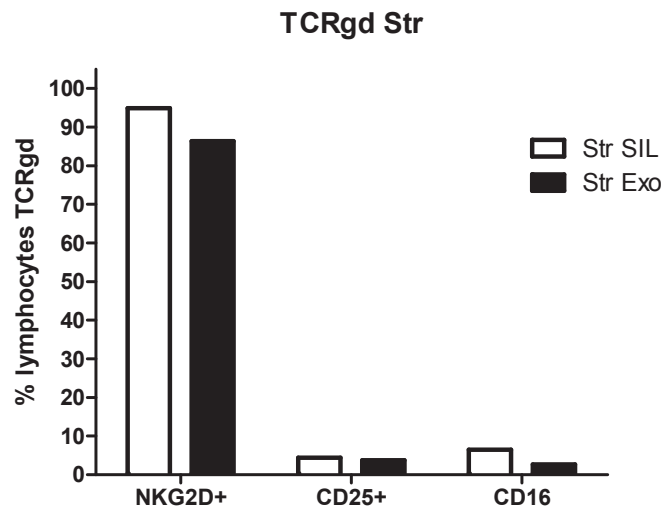


Fig. R11 : Caractérisation des lymphocytes NKp46+ infiltrant le stroma avoisinant les SIL
 Cellules issues de biopsie du stroma cervical adjacent à une lésion (Str SIL) ou adjacent à un exocol normal (Str Exo) provenant de la même patiente (n = 1)

Les cellules TCR $\gamma\delta$ expriment majoritairement NKG2D, par contre, seul une minorité expriment CD25 ou CD16. Cette expérience unique ne nous permet pas de constater des différences entre les lésions et l'exocol.

B. Interaction des cellules NK avec les VLP de HPV16.

Dans cette deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'interaction de cellules NK avec les VLP d'HPV16. Pour rappel, HPV16 est le virus retrouvé dans plus de 50% des cancers du col de l'utérus. Comme il n'est pas possible de produire le virus HPV in vitro, nous avons utilisé des virus like particles (VLP).

Des expériences antérieures menées au laboratoire ont suggéré une prolifération des cellules NK induite par les VLP d'HPV. Nous avons donc tenté de confirmer ces résultats en mettant au point l'étude de la prolifération par marquage à la carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE).

Afin de voir si l'effet prolifération est préférentiel aux cellules NK, nous avons mené en parallèle des cinétiques d'entrée sur les PBMC et les cellules NK triées.

1. Tri des cellules NK

Les cellules NK ont été triées par sélection négative et un exemple représentatif de la proportion de cellules NK avant et après tri est repris à la figure R13. La pureté est vérifiée au

FACS avec le cocktail d'anticorps CD16-PB, CD56-PE et CD3-FITC. On peut constater l'élimination des granulocytes, de presque tous les monocytes (Fig. R13 A et D) ainsi que des lymphocytes CD3+ et de la sélection des cellules CD16+CD56+CD3- après tri (Fig. R13 B, C, E et F). Après tri, les cellules NK (CD16+CD56+CD3-) constituent 95,6% des lymphocytes et 92,8% des cellules totales.

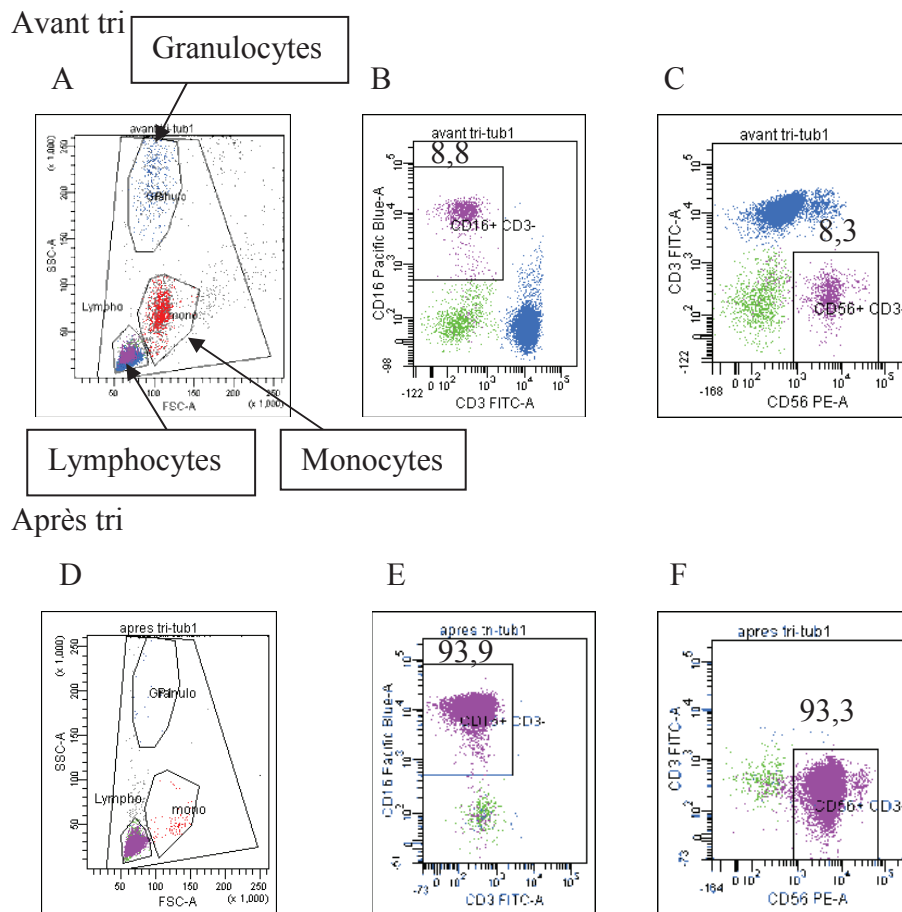


Fig. R13 : Exemple de tri négatif des cellules NK.

La population lymphocytaire est sélectionnée sur base de la taille et de la granulosité des cellules (A et D). A-C : cellules avant tri. D-E : cellules après tri. Les cellules NK sont détectées en combinant les gates CD16+ CD3- et CD56+ CD3- (CD16+ CD3- OR CD56+ CD3-).

2. Effet prolifératif des VLP d'HPV16 sur les cellules NK.

Des résultats préliminaires réalisés sur des cellules NK triées montraient une prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée en présence de VLP d'HPV16. Afin d'étudier

la prolifération des cellules NK induite par les VLP en présence d'autres populations leucocytaires, nous avons mis au point le test de prolifération basé sur le marquage des cellules par le CFSE. Comme nous voulions également utiliser ce test sur des cellules NK triées, nous avons adapté ce test à un petit nombre de cellules. Le CFSE peut être toxique et inhiber la prolifération cellulaire (Quah et al., 2007). Il est donc nécessaire de déterminer les conditions optimales afin d'obtenir une prolifération cellulaire tout en ayant un marquage suffisant pour permettre plusieurs cycles de divisions. Nous avons choisi de réaliser ce test sur 3×10^6 cellules.

Tout d'abord, nous avons marqué 3×10^6 PBMC avec 3 concentrations différentes en CFSE : 0,5 ; 0,75 et $1 \mu\text{M}$ afin de déterminer la concentration optimale pour le marquage. Nous avons évalué la mortalité cellulaire après 7 jours de culture au moyen d'un marquage par le DAPI. Il n'y a pas eu de différence significative de mortalité entre nos 3 concentrations en CFSE après activation par la PHA (Fig. R14). Nous avons donc choisi de continuer avec la concentration de $1 \mu\text{M}$ en CFSE afin d'être le plus brillant possible pour distinguer plus facilement les pics des différentes générations (Fig. R15).

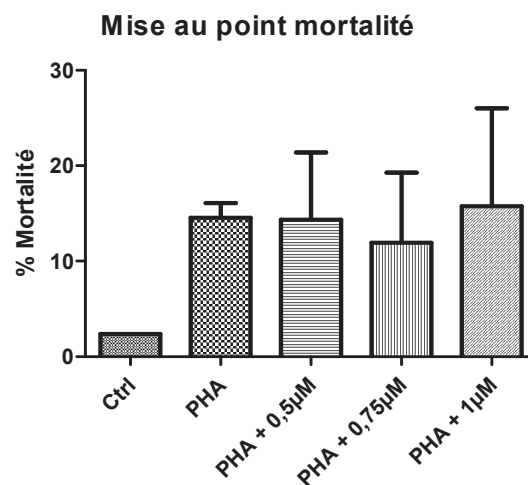


Fig. R14 : Evaluation de la mortalité cellulaire aux différentes concentrations en CFSE testée après 7 jours de culture en présence de PHA.

L'expérience sur les cellules contrôle non marquées n'a été effectuée qu'une seule fois. Les autres conditions ont été testées 2 fois (valeurs exprimées en moyenne de pourcentage des cellules \pm l'erreur standard).

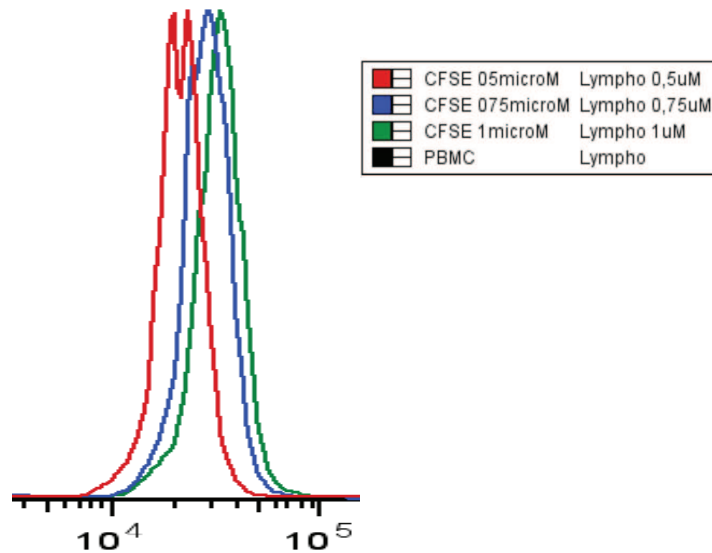


Fig R15 : Superposition des pics de CFSE au jour 3 pour les 3 concentrations différentes.

La moyenne de fluorescence est de 250 pour les cellules non marquées, 20.956 pour les cellules marquées avec 0,5 μ M de CFSE, 29.422 pour les cellules marquées avec 0,75 μ M de CFSE et 34.068 pour les cellules marquées avec 1 μ M de CFSE

Il nous restait toutefois un problème, la présence de plusieurs pics de CFSE dans toutes nos conditions. Le CFSE peut entrer et sortir librement de la cellule s'il ne se lie pas à une protéine cytoplasmique. Les images illustrées à la figure R16a semblent montrer que le CFSE rentrait et sortait très aléatoirement de nos cellules, formant ainsi plusieurs populations de cellules ayant plus ou moins gardé le CFSE dans leur cytoplasme. Ce problème a pu être contourné en ajoutant au protocole une incubation d'un quart d'heure à 37°C après le premier lavage suivant l'ajout du CFSE. Nous avons alors obtenu un marquage homogène avec un seul pic (Fig. R16b). Dans des conditions optimales, après prolifération, il est possible d'obtenir des pics séparés pour chaque cycle de division (Fig. R17a). Malheureusement, dans la majorité des cas on peut juste déterminer un pourcentage de cellules en prolifération (Fig. R17b)

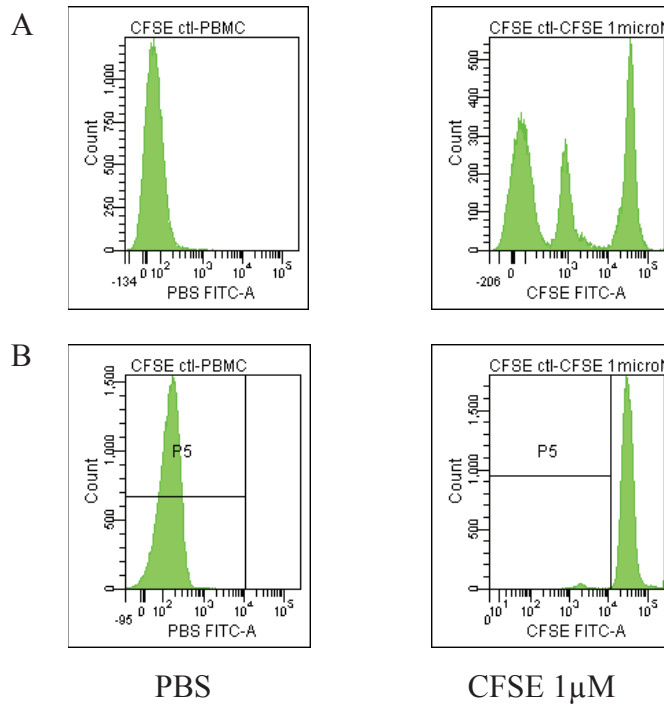


Fig. R16 : Histogramme représentant le marquage des lymphocytes par le CFSE.

En A, protocole classique de marquage. En B, lavage supplémentaire après une incubation de 15 min à 37°C. Les cellules sont non marquées (PBS) ou marquées par du CFSE à la concentration de 1µM.

Une fois la mise au point terminée, nous étions en mesure de réaliser nos expériences en présence de VLP d'HPV16 à 5µg/ml. Comme contrôle positif, nous avons utilisé la PHA à 1µg/ml et de l'IL-2 à une concentration de 500U/ml. Les tests ont été réalisés sur des PBMC avec un marquage NKp46 afin de déterminer la population de cellules NK et également sur des cellules NK triées. Les cultures ont été analysées au jour 3, 5 et 7 après marquage et stimulation (Fig. R18).

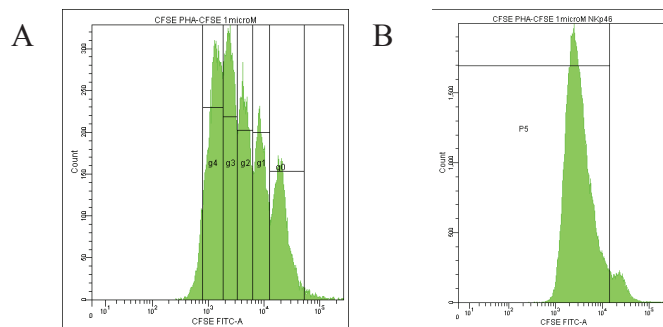


Fig. R17 : Représentation du résultat obtenu suite à un marquage au CFSE (1µM) stimulé avec 1µg/ml de PHA pendant 5 jours. En A, cas où les générations successives sont bien distinctes et en B, cas où ces générations sont confondues en 1 seul pic.

Afin de déterminer le meilleur contrôle positif, nous en avons testé deux sur nos populations cellulaires, la PHA et l'IL-2. La PHA constitue un très bon contrôle positif pour les PBMC. En effet, au jour 5, $87,7\% \pm 1,3$ d'entre eux sont en prolifération tandis que l'IL-2 induit bien une prolifération mais celle-ci est nettement plus faible ($16,7\% \pm 4,4$). La taux de prolifération n'augmente plus par la suite. Grâce au marquage NKp46, nous avons pu identifier les cellules NK au sein des PBMC. Pour ces cellules, la PHA induit également une prolifération mais moins intense et plus progressive au cours du temps ($28,2\% \pm 8,3$ au jour 5 et $39\% \pm 17,1$). Cette prolifération est fortement similaire à celle induite par l'IL-2 ($24,2\% \pm 8,1$ au jour 5 et $37\% \pm 9,9$).

Dans le cas des cellules NK triées, la PHA n'a pas induit de prolifération. Par contre, l'IL-2 induit bien une prolifération qui reste faible jusqu'au jour 5 ($4,9\% \pm 0,3$ cellules en prolifération) mais qui augmente au jour 7 ($35,8\% \pm 0,6$ cellules en prolifération).

C'est donc l'IL-2 qui est un contrôle positif de choix pour les cellules NK triées.

Concernant l'effet des VLP, aucune prolifération n'a été constatée sur les PBMC. Quelques cellules NKp46 semblent être en prolifération au jour 3 et 5 mais plus aucune différence n'est observée avec la condition sans stimulation au jour 7. Nous n'avons pu réaliser qu'une seule expérience sur les cellules NK triées et elle ne nous permet pas de confirmer les résultats obtenus avec la thymidine tritiée

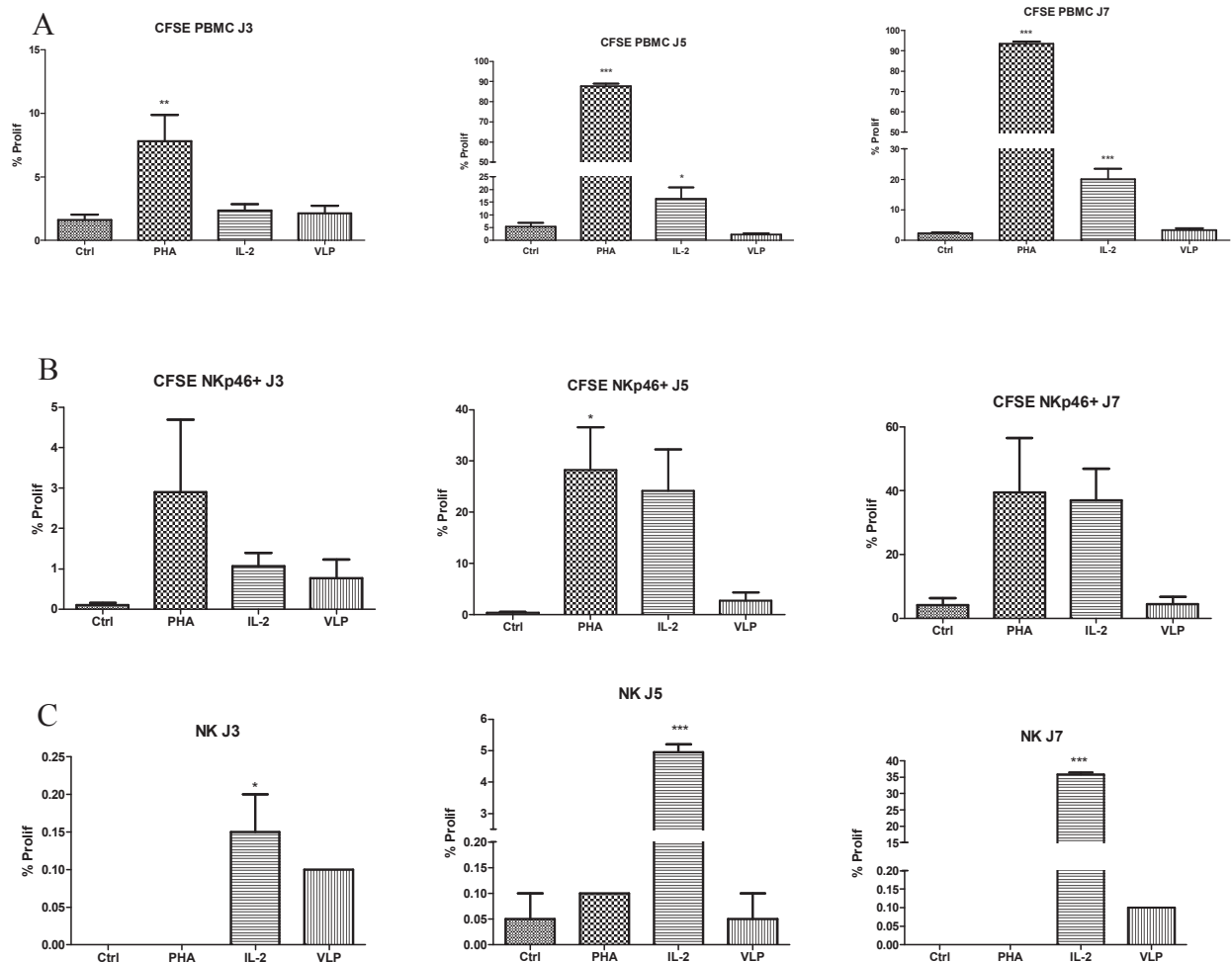


Fig. R18 : Taux de prolifération obtenus au jour 3, 5 et 7 sur des PBMC, des PBMC marqués avec NKp46 et des cellules NK triées. En A, le test de prolifération a été réalisé sur des PBMC (n = 6). En B le test est effectué sur des PBMC où les cellules NK sont sélectionnées grâce à l'anticorps NKp46 (n = 3). Et enfin en C, le test est réalisé sur des cellules NK triées (n = 1). Les expériences ont été réalisées en duplicata (valeurs exprimées en moyenne de pourcentage des cellules \pm l'erreur standard ; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$).

C. Expression de MICA à la surface des cellules HPV+.

Le récepteur NKG2D est un récepteur primordial dans l'activité anti-tumorale des cellules NK et $TCR\gamma\delta$ (Guerra et al., 2008). Pour pouvoir exercer leur fonction cytotoxique via NKG2D, un ligand de ce récepteur doit être exprimé à la surface des cellules cibles. Nous avons étudié l'expression de MICA, un ligand de NKG2D, sur des cellules HPV positives (CaSki et SiHa) ou négatives (C33a) dérivées de cancer du col de l'utérus. Nous avons également étudié l'effet du $TGF\beta 1$ sur cette expression car cette cytokine est surexprimée dans les lésions cervicales associées aux HPV.

1) Lignées HPV+ vs lignées HPV-

En préalable aux marquages, l'absence de mycoplasme dans les lignées a été vérifiée par un test biochimique exploitant l'activité enzymatique des mycoplasmes présents dans le milieu ; car ceux-ci sont susceptibles de modifier les marqueurs de surface et les fonctions des cellules infectées. Les résultats se sont avérés négatifs, ce qui suggère que les cellules n'étaient pas contaminées (données non illustrées).

Nous avons d'abord confirmé les résultats antérieurs obtenus au laboratoire, à savoir une expression de MICA plus importante à la surface de cellules HPV positives par rapport à des cellules HPV négatives. Ces expériences avaient été réalisées avec un anticorps BAM 195 non couplé à un fluorochrome fourni par le Dr Pende. Nous avons également testé un anticorps commercial anti-MICA directement couplé au PE (Fig. R19).

Nous obtenons les mêmes résultats que précédemment avec l'anticorps BAM 195 ; c'est-à-dire une expression membranaire significativement plus élevée sur les lignées HPV positives (CaSki et SiHa) par rapport à la lignée HPV négative (C33a) (Fig. R19 A). Nous observons des résultats similaires avec l'anticorps commercial. Cependant, l'intensité de fluorescence est plus faible et nous n'observons pas de différence significative entre SiHa et C33a (Fig. R19 B).

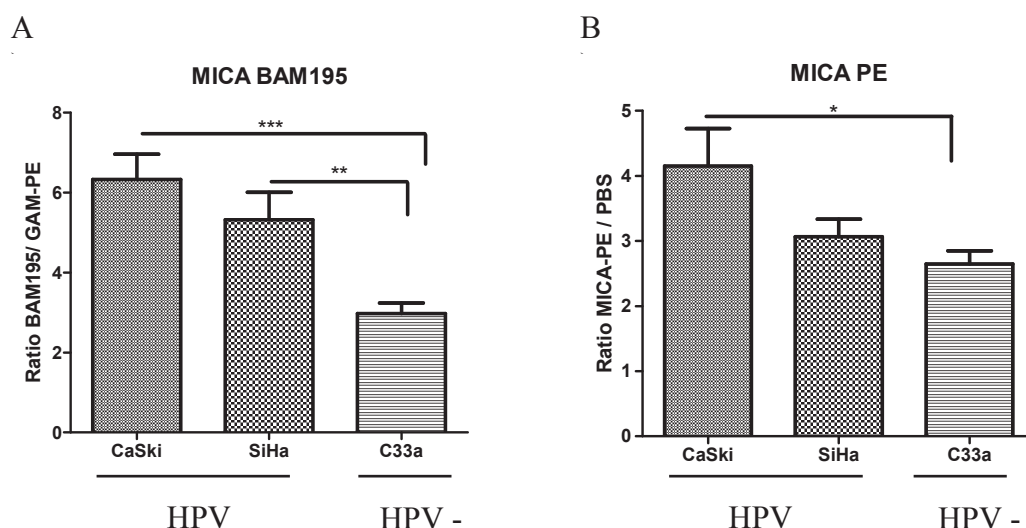


Fig. R19 : Marquage MICA membranaire sur lignées cellulaires. En a, un marquage indirect est réalisé avec l'anticorps BAM 195 couplé à l'anticorps secondaire GAM-PE (n = 10 pour SiHa et n = 12 pour CaSki et C33a) et en b, un marquage direct est réalisé avec l'anticorps MICA de Santa-Cruz couplé à du PE (n = 10 pour CaSki et SiHa et n = 12 pour C33a) (résultats exprimés en moyenne des ratios \pm l'erreur standard ; * = p<0,05, ** = p<0,01 et *** = p<0,001).

2) Effet du TGFβ1 sur les lignées cellulaires.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du TGFβ1, cytokine immunosuppressive exprimée de façon plus importante dans la TZ et dans les SIL du col de l'utérus (Giannini et al., 1998; Herfs et al., 2008), sur l'expression membranaire de MICA. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent une augmentation de l'expression de MICA suite à la culture de cellules CaSki avec du TGFβ1.

Les cellules ont été placées en plaque 6 puits à raison de 50×10^4 cellules par puits. Comme le détachement des cellules induit un stress cellulaire, le TGFβ1 a été ajouté le jour après la mise en culture des cellules.

Un effet antiprolifératif du TGFβ1 a été constaté sur les lignées CaSki et SiHa. En effet, plus la concentration en TGFβ1 était grande, moins les cellules proliféraient dans les puits (Fig. R20).

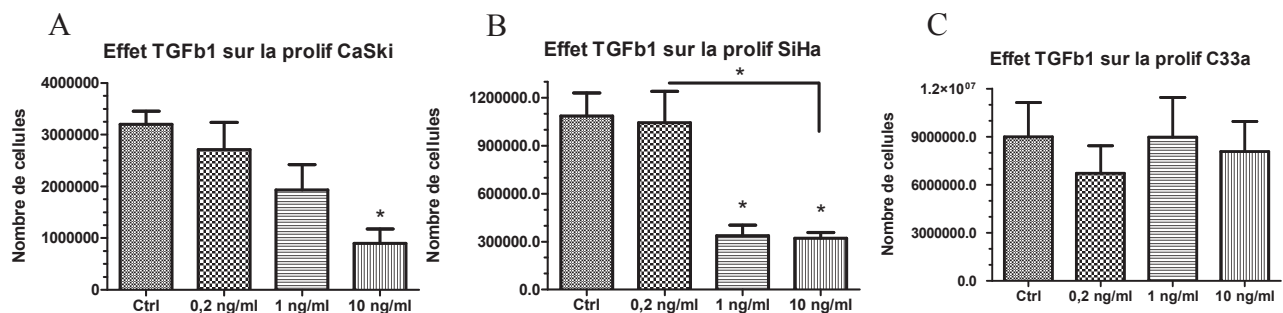


Fig R20 : Représentation du nombre de cellules après 7 jours de culture avec différentes concentrations en TGFβ1. A : cellules CaSki, B : cellules SiHa, C : cellules C33a (n = 5 pour la condition 0,2ng/ml. Pour les autres conditions, n = 6 pour CaSki et n = 7 pour SiHa et C33a) (valeurs exprimées en moyenne de comptage ± l'erreur standard ; * = p<0,05).

Un changement morphologique a également été observé suite à l'addition de TGFβ1 (Fig.R21). En effet, plus la concentration en TGFβ1 est grande, plus les cellules ont tendance à grossir et devenir plus granuleuses.

Ce phénomène est observé dans les lignées positives pour HPV mais pas pour les lignées dépourvues d'HPV. Suggérant un effet du TGFβ1 en présence du génome d'HPV. Il a été rencontré 5 fois sur 6 avec les cellules CaSki et dans toutes les expériences (n = 7) pour les SiHa.

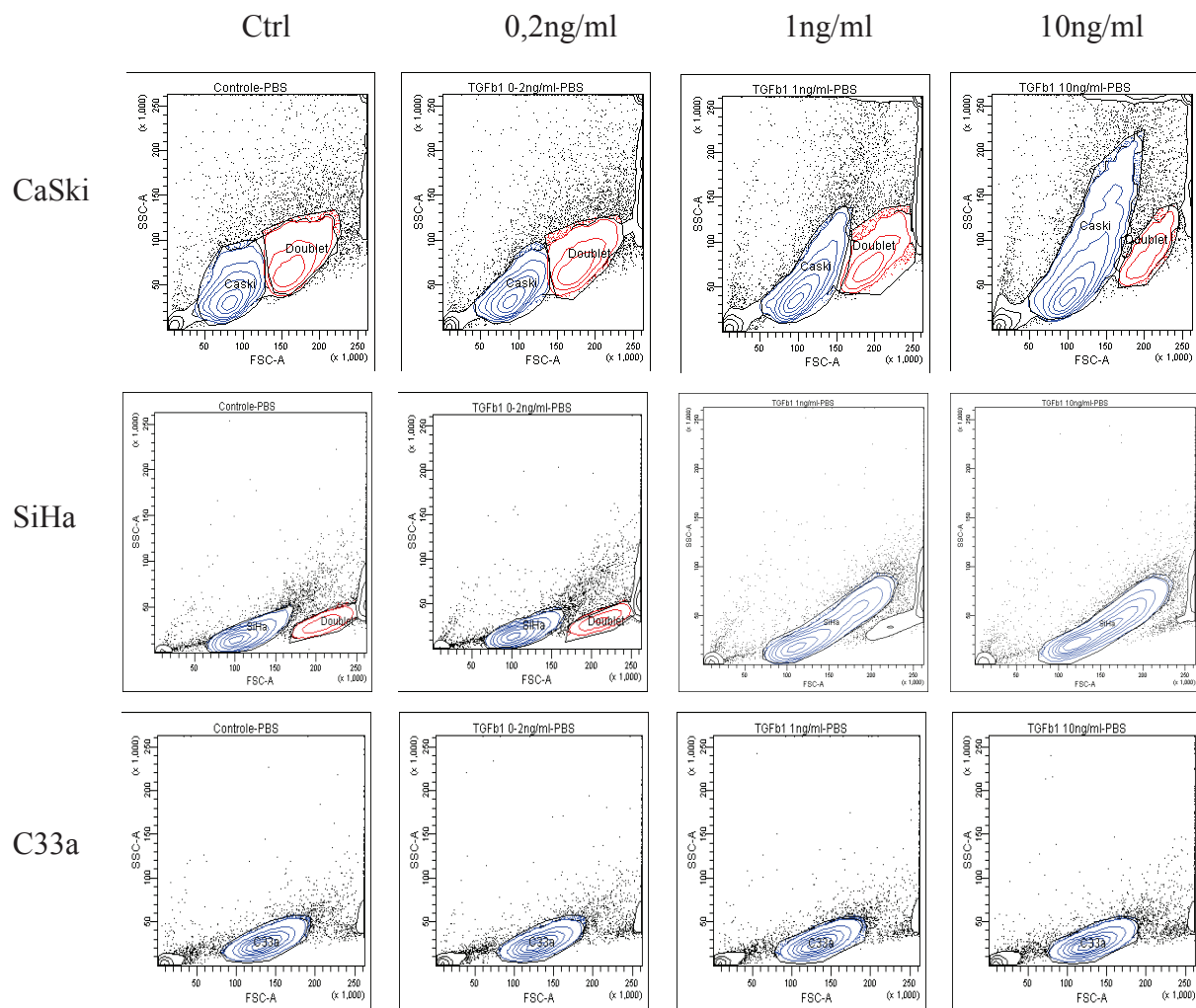


Fig. R21 : Diagramme de dispersion selon FSC (taille) et SSC (granulosité) des différentes lignées cellulaires selon la concentration en TGFβ1.

La figure R22 représente les résultats obtenus pour l'expression de MICA. Les résultats obtenus diffèrent en fonction de l'anticorps utilisé.

Avec l'anticorps BAM 195, une augmentation significative de l'expression de MICA est détectée entre la condition contrôle ($6,22 \pm 0,85$) et 10 ng/ml ($7,66 \pm 1$) ($p = 0,0313$) pour les SiHa et une légère tendance d'augmentation de MICA est détectée dans les 2 autres lignées. Une expérience a également été réalisée sur des kératynocytes normaux (KN). Le ratio diminue de moitié entre la condition contrôle et la condition à 10 ng de TGFβ1 par ml.

Avec l'anticorps de chez Santa Cruz, une augmentation toujours significative est observée pour les cellules SiHa. La moyenne du ratio vaut $3,25 \pm 0,37$ pour la condition contrôle et $3,76 \pm 0,43$ pour la condition 10ng/ml ($p = 0,0313$). Les cellules CaSki et C33a semblent plutôt montrer une diminution de l'expression de MICA. Pour les KN, on observe encore une

diminution, moins importante pour la condition 1 ng/ml mais qui diminue toujours de moitié pour la condition 10 ng/ml. Il conviendra de répéter cette expérience ultérieurement.

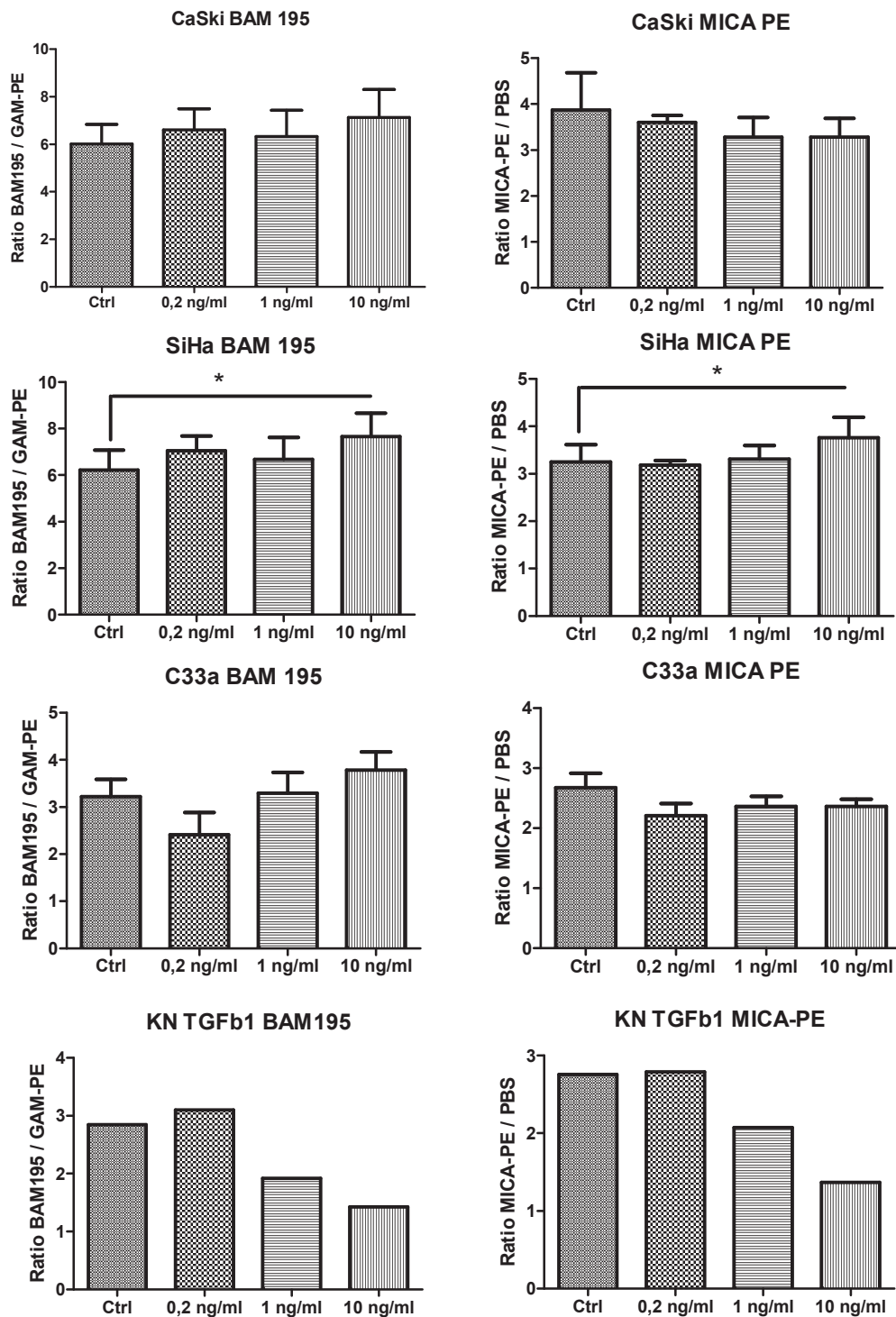


Fig. R22 : Expression de MICA à la surface des lignées CaSki, SiHa et C33a en présence de TGFβ1. Les cellules sont cultivées 7 jours en milieu seul ou additionné de 0,2, 1 et 10ng/ml de TGFβ1. Les graphiques représentent la moyenne des ratios de fluorescence de MICA (n = 5 pour la condition 0,2 ng/ml. Pour les autres conditions, n = 6 pour CaSki et SiHa et n = 7 pour C33a) (valeurs exprimées en moyenne des ratio ± l'erreur standard ; * = p<0,05).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Généralement, les réponses anti-tumorale et anti-virale sont attribuées principalement à l'immunité adaptatrice. Cependant, de plus en plus d'études mettent en avant l'importance de l'immunité innée, et plus particulièrement celles des lymphocytes innés tel que les cellules NK et les cellules TCR $\gamma\delta$ dans ces réponses (Guerra et al., 2008; Liu et al., 2008).

Le système immunitaire joue un rôle prédominant dans le cancer du col de l'utérus. Ceci a été démontré par une plus grande incidence des lésions cervicales chez les femmes immunodéprimées suite à une infection par HIV (Ellerbrock et al., 2000). Vu l'importance de la défense immunitaire, nous nous sommes intéressés à 3 aspects différents afin de mettre en avant un rôle des cellules NK et TCR $\gamma\delta$ dans le modèle du cancer du col de l'utérus.

De nouveaux récepteurs ont été mis en évidence pour ces lymphocytes, permettant une meilleure caractérisation de ceux-ci. Nous les avons donc étudié au sein de lymphocytes issus du sang circulant et de cultures de biopsies cervicales de lésions épithéliales et du stroma de cet épithélium (Jacobs et al., 2003).

Nous nous sommes également focalisés sur l'effet du virus HPV sur les cellules NK. Il nous a été impossible de travailler avec le virus HPV car celui-ci a besoin de la différenciation complète de l'épithélium pour sa réplication. Nous avons donc travaillé avec des VLP d'HPV. Ceux-ci exposent le même épitope que le virus nécessaire pour l'interaction avec les cellules immunitaires et stimulent la réponse immunitaire (Kirnbauer et al., 1992). Nous nous sommes intéressés à l'effet prolifératif des VLP d'HPV 16 sur les cellules NK.

Enfin, au vu de l'importance du récepteur NKG2D dans la défense anti-tumorale induite par les cellules NK et TCR $\gamma\delta$ (Guerra et al., 2008), nous avons étudié l'expression d'un de ses ligands, MICA sur des lignées HPV positives ou négatives. Nous avons également voulu observer l'effet du TGF β 1 sur l'expression de ce ligand. Le TGF β 1 est une cytokine immunosuppressive exprimée de façon importante dans les SIL (Giannini et al., 1998) et semble influencer la surveillance immunitaire dans les cancers de cellules gliales en modulant l'expression de ligands de NKG2D (Eisele et al., 2006).

Le marqueur NKp46 s'est montré être un marqueur de choix pour l'identification des cellules NK. En effet, ce marqueur n'est pas porté par les cellules CD3 positives et donne une proportion de cellules similaire à celle obtenue avec le marquage classique des cellules NK (CD16+ CD56+ CD3-). Tout comme les lymphocytes T cytolytiques, les cellules NK peuvent

exprimer le récepteur CD8, mais elles l'expriment plus faiblement. Nous avons obtenu une proportion 39,4% de cellules NK positives pour le CD8 correspondant à ce qui a été décrit dans la littérature. Ces cellules sont connues pour avoir un potentiel cytolytique plus fort que les cellules NK CD8- (Addison et al., 2005).

Nous avons également remarqué que les cellules TCR $\gamma\delta$ pouvaient exprimer le CD16, ce qui a déjà été démontré dans d'autres études (Groh et al., 1989). Il serait toutefois intéressant de savoir si cette sous-population de cellules TCR $\gamma\delta$ est capable de pratiquer l'ADCC comme les cellules NK. Ce test pourrait être réalisé en triant ces cellules afin de les mettre en culture avec des cellules CaSki. On ajoutera alors un anticorps présent à la surface de ces-dernières et un test de cytotoxicité au chrome⁵¹ radioactif sera réalisé.

Nous avons détecté très peu de cellules NK dans la population lymphocytaire infiltrant l'épithélium. Très peu d'entre elles exprimaient le récepteur CD16 et près de 35% exprimaient le récepteur CD56 conformément aux résultats antérieurs (Jacobs et al., 2003). Quarante pourcents de ces cellules CD56+ étaient fortement positives pour ce marqueur (CD56^{bright}). Nous avons observé une diminution d'expression du CD16 suite à la culture en présence d'IL-2, suggérant que cette diminution est induite par l'IL-2.

On a constaté que 70% des cellules NK étaient CD8+. Vu leur meilleur potentiel il serait intéressant de répéter ces expériences sur un plus grand nombre de cas et sur de l'épithélium normal afin de déterminer si ces cellules sont recrutées spécifiquement lors de lésions.

La plupart des cellules NK infiltrantes étaient bien activées. En effet, 75% d'entre elles exprimaient le CD69. Toutes les cellules NK étaient positives pour le récepteur NKp44. Toutefois, d'après Cella et al., les cellules NK peuplant les muqueuses sont positives pour NKp44 sans activation préalable. Elles ont la capacité de sécréter de l'IL-22, une cytokine pro-inflammatoire des muqueuses et CCL20 qui induit un chimiotactisme sur les cellules T CD4, les cellules B, les cellules dendritiques et les cellules T Th₁₇ (Cella et al., 2009).

Les cellules TCR $\gamma\delta$ sont bien positives pour le récepteur activateur NKG2D. Il faudrait toutefois trier les cellules et voir si le récepteur est toujours fonctionnel afin de s'assurer qu'elles n'ont pas perdu leur activité cytolytique. Seul une faible proportion de cellules TCR $\gamma\delta$ exprime le marqueur d'activation CD25. Comme ces cellules proviennent d'une lésion, on s'attendrait plutôt à ce qu'elles soient activées et donc positives pour ce marqueur.

Dans la population des lymphocytes infiltrant le stroma avoisinant des SIL, on constate une augmentation du nombre de cellules NK par rapport au stroma d'exocol normal. Au sein des

cellules NK, une nette augmentation du récepteur CD56 est observée dans le stroma avoisinant les lésions dont la majorité sont CD56^{bright}. La proportion de cellules NKp46 CD8 diminue légèrement par rapport à l'exocol normal. Concernant, les marqueurs d'activation, il semble qu'il y ait une augmentation de l'expression du CD69.

Comme cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, et que l'échantillon d'exocol normal contenait très peu de cellules NK (0,1%), il faudra renouveler cette expérience et augmenter le nombre d'évènements des cellules NK afin de mieux caractériser les diverses sous-populations et de pouvoir tirer de réelles conclusions. Pour les cellules TCR $\gamma\delta$, pas de changements majeurs entre l'échantillon normal et l'échantillon de la lésion n'a pu être observé. Toutefois, comme cette expérience n'a été menée qu'une seule fois, il conviendra de la répéter afin de confirmer les résultats obtenus.

La technique de CFSE est délicate à mettre au point sur un petit nombre de cellules car le CFSE est cytotoxique pour les cellules et peut avoir un effet antiprolifératif sur ces dernières (Quah et al., 2007). Il faut en plus s'assurer d'avoir un marquage uniforme car le CFSE peut entrer et sortir de la cellule si celui-ci n'est pas couplé à une protéine cytoplasmique. Il faut donc s'assurer que nos cellules sont marquées uniformément.

Le test de prolifération aux CFSE fonctionne maintenant correctement sur un petit nombre de cellules car les contrôles positifs montrent bien une prolifération. Nous avons déterminé que le contrôle positif de choix pour les PBMC est la PHA alors que celle-ci n'a aucun effet sur les cellules NK triées. Lors des expériences sur les PBMC marqués avec NKp46, on constate que suite à la stimulation par la PHA, la proportion de cellules NKp46 positives diminue ; suggérant une prolifération d'autres types cellulaires. Cependant un taux de prolifération est tout de même détecté, suggérant un effet indirect des autres types cellulaires présents dans le milieu. La stimulation par l'IL-2 montre un effet faible sur les PBMC mais induit bien une prolifération sur les cellules NK (triées ou non). Le contrôle positif de choix pour les cellules NK est donc l'IL-2.

Malheureusement, nous n'avons pas pu mettre en évidence une prolifération des cellules NK suite à la réalisation d'une co-culture avec des VLP d'HPV16. Une très faible proportion de cellules (0,1%) semble entrer en prolifération mais leur intensité de fluorescence ne diminue pas au cours du temps. Il est donc possible que ces cellules aient incorporé moins de CFSE ou qu'elles soient abimées. Afin de s'assurer que ce sont bien des cellules et non des débris ou des agrégats, il conviendrait de les trier sur lame par FACS et d'observer leur morphologie au microscope confocal. Le contrôle positif a pourtant bien fonctionné. Ce résultat négatif est

peut-être dû à la dégradation des VLP dans cette expérience ou à une anomalie chez le donneur. Comme elle n'a été réalisée qu'une seule fois, des expériences ultérieures devraient être réalisées afin de pouvoir tirer des conclusions.

Cependant, des résultats antérieurs du laboratoire montraient une prolifération des cellules NK marquées à la thymidine tritiée et mises en co-culture avec des VLP d'HPV16. De plus, les VLP d'HPV16 induisent bien une prolifération des cellules NK puisqu'un autre test de prolifération, le MTT, confirme les résultats obtenus avec la thymidine tritiée. Les VLP ne venaient toutefois pas du même pool que ceux utilisés pour le test de prolifération au CFSE. Le test au MTT consiste en la réduction de l'anneau de tétrazolium en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives. Le milieu change alors de couleur. La variation de couleur est estimée par densité optique et l'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et reflète leur activité métabolique.

L'analyse du ligand de NKG2D MICA a confirmé les résultats obtenus auparavant, à savoir une expression membranaire plus élevée sur les lignées HPV positives (CaSki et SiHa), plus élevée que sur les lignées HPV négatives (C33a). Deux anticorps anti-MICA différents ont été utilisés. L'anticorps BAM195 non couplé à un fluorochrome qui nous a été fourni par le docteur Pende et l'anticorps anti-MICA (clone 2C10) couplé à du PE. L'anticorps BAM195 a révélé une différence significative entre les lignées HPV positives et négatives alors que l'anticorps commercial n'a mis en évidence qu'une différence significative entre CaSki et C33a. Cette différence peut être due au fait que les 2 anticorps sont des clones différents mais également à l'amplification du signal due au marquage indirect.

Ces résultats confirment donc ceux obtenus auparavant et suggèrent que les cellules NK et TCR $\gamma\delta$ peuvent lyser préférentiellement les cellules infectées par HPV via leur récepteur NKG2D.

L'expression de ligands de NKG2D est modulée par l'infection virale (Groh et al., 2001) mais également par le microenvironnement. Le TGF β 1 est significativement augmenté dans les SIL de haut grade et dans la zone de transformation, site préférentiel de développement des SIL (Giannini et al., 1998; Herfs et al., 2008). De plus, il a été démontré que le TGF β 1, une cytokine immunosuppressive surexprimée au niveau des cellules gliales cancéreuses, peut induire une diminution de l'expression de MICA entraînant alors une diminution de la

surveillance immunitaire (Eisele et al., 2006). Cependant, des expériences antérieures au laboratoire ont montré que le TGF β 1 induisait une augmentation de l'expression de MICA par les cellules CaSki. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de MICA sur des lignées HPV positives ou négatives mises en culture avec du TGF β 1. Les résultats antérieurs sur la lignée CaSki n'ont pas pu être reproduits. Une tendance à l'augmentation est bien observée mais celle-ci n'est pas significative. Cette variabilité peut être due au fait que les cellules n'avaient pas subi le même nombre de passages et que certaines d'entre elles ont subi une différenciation. Il conviendra donc de répéter ces expériences sur un autre lot de cellules CaSki. L'expérience a aussi été menée sur les cellules SiHa et C33a. Rien de significatif n'a pu être mis en avant sur la lignée C33a. Par contre, l'augmentation d'expression entre la condition contrôle et celle avec 10 ng/ml de TGF β 1 est significative. Les kératinocytes normaux semblent diminuer l'expression de MICA suite à l'exposition au TGF β 1. Comme l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, nous ne pouvons pas tirer des conclusions sur ces cellules. Les conditions expérimentales étaient les mêmes que pour les expériences réalisées auparavant.

Nous avons pu remarquer que le TGF β 1 semblait avoir un effet antiprolifératif sur les lignées épithéliales positives pour HPV. Cependant nous n'avons pas testé beaucoup de lignées et une étude montre que certaines lignées épithéliales positives pour HPV subissent cet effet (HeLa, CaSki, SiHa) ; alors que d'autres non (ME-180). Il en va de même pour les lignées négatives : C33a ne subit pas l'effet antiprolifératif alors que HT-3 le subit (Kang et al., 1998). Ils n'ont pas trouvé de différence significative par rapport à la condition sans TGF β 1 pour les cellules CaSki et SiHa. Ils ajoutaient 5 ng/ml de TGF β 1 et la mesure de la prolifération était effectuée après une culture de 24h. Le fait que nos cellules n'étaient comptées qu'après 7 jours de culture avec le TGF β 1 explique sûrement l'effet plus prononcé que nous avons obtenu.

De plus sur le diagramme de dispersion selon FSC et SSC, nous avons également observé un changement de morphologie des cellules CaSki et SiHa (HPV positives). Cet effet n'a pas été observé pour les cellules C33a (HPV négatives).

BIBLIOGRAPHIE

- Addison, E.G., North, J., Bakhsh, I., Marden, C., Haq, S., Al-Sarraj, S., Malayeri, R., Wickremasinghe, R.G., Davies, J.K., and Lowdell, M.W. (2005). Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology* *116*, 354-361.
- Auersperg, N. (1964). LONG-TERM CULTIVATION OF HYPODIPLOID HUMAN TUMOR CELLS. *J Natl Cancer Inst* *32*, 135-163.
- Baker, C.C., Phelps, W.C., Lindgren, V., Braun, M.J., Gonda, M.A., and Howley, P.M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* *61*, 962-971.
- Biassoni, R., Pessino, A., Bottino, C., Pende, D., Moretta, L., and 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.
- Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K.V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* *87*, 796-802.
- Bottino, C., Biassoni, R., Millo, R., Moretta, L., and Moretta, A. (2000). The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering. *Hum Immunol* *61*, 1-6.
- Braud, V.M., Allan, D.S., Wilson, D., and McMichael, A.J. (1998). TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* *8*, 1-10.
- Burghardt, E., and Ostor, A.G. (1983). Site and origin of squamous cervical cancer: a histomorphologic study. *Obstet Gynecol* *62*, 117-127.
- Caligiuri, M.A. (2008). Human natural killer cells. *Blood* *112*, 461-469.
- Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K., Doherty, J.M., Mills, J.C., and Colonna, M. (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* *457*, 722-725.
- Chan, A., Hong, D.L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T., and Bowness, P. (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* *179*, 89-94.
- Chan, C.W., and Housseau, F. (2008). The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ* *15*, 58-69.
- Collins, S., Mazloomzadeh, S., Winter, H., Blomfield, P., Bailey, A., Young, L.S., and Woodman, C.B. (2002). High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship. *BJOG* *109*, 96-98.

- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633-640.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123-133.
- Cutts, F.T., Franceschi, S., Goldie, S., Castellsague, X., de Sanjose, S., Garnett, G., Edmunds, W.J., Claeys, P., Goldenthal, K.L., Harper, D.M., and Markowitz, L. (2007). Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull World Health Organ* 85, 719-726.
- de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., and zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
- Dohring, C., and Colonna, M. (1996). Human natural killer cell inhibitory receptors bind to HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 26, 365-369.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110, 525-541.
- Eisele, G., Wischhusen, J., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Waldhauer, I., Steinle, A., Weller, M., and Friese, M.A. (2006). TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 129, 2416-2425.
- Ellerbrock, T.V., Chiasson, M.A., Bush, T.J., Sun, X.W., Sawo, D., Brudney, K., and Wright, T.C., Jr. (2000). Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA* 283, 1031-1037.
- Falco, M., Cantoni, C., Bottino, C., Moretta, A., and Biassoni, R. (1999). Identification of the rat homologue of the human NKp46 triggering receptor. *Immunol Lett* 68, 411-414.
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A., and 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.
- Frazer, I.H. (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4, 46-54.
- Giannini, S.L., Al-Saleh, W., Piron, H., Jacobs, N., Doyen, J., Boniver, J., and Delvenne, P. (1998). Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 113, 183-189.
- Giannini, S.L., Hubert, P., Doyen, J., Boniver, J., and Delvenne, P. (2002). Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer* 97, 654-659.
- Gonzalez, S., Lopez-Soto, A., Suarez-Alvarez, B., Lopez-Vazquez, A., and Lopez-Larrea, C. (2008). NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol* 29, 397-403.

- 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., and Alkan, S.S. (2006). Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists. *Int Immunol* 18, 1115-1126.
- Greimers, R. (2008). Cytométrie en flux, analyses multiparamétriques et tri cellulaire, Cours de première année de Master en Sciences biomédicales.
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12445-12450.
- Groh, V., Porcelli, S., Fabbi, M., Lanier, L.L., Picker, L.J., Anderson, T., Warnke, R.A., Bhan, A.K., Strominger, J.L., and Brenner, M.B. (1989). Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 169, 1277-1294.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., and Spies, T. (2001). Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2, 255-260.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734-738.
- Grossi, C.E., Ciccone, E., Zeromski, J., Moretta, A., and Moretta, L. (1992). Functional and morphologic characterization of human T lymphocytes expressing the TCR gamma/delta. *Biotherapy* 5, 1-9.
- Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.M., and Raulet, D.H. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28, 571-580.
- Hanna, J., and Mandelboim, O. (2007). When killers become helpers. *Trends Immunol* 28, 201-206.
- Hayakawa, Y., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Darcy, P.K., Diefenbach, A., Raulet, D., and Smyth, M.J. (2002). Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *J Immunol* 169, 5377-5381.
- Herfs, M., Hubert, P., Kholod, N., Caberg, J.H., Gilles, C., Berx, G., Savagner, P., Boniver, J., and Delvenne, P. (2008). Transforming growth factor-beta1-mediated Slug and Snail transcription factor up-regulation reduces the density of Langerhans cells in epithelial metaplasia by affecting E-cadherin expression. *Am J Pathol* 172, 1391-1402.
- Hofmann, K.J., Cook, J.C., Joyce, J.G., Brown, D.R., Schultz, L.D., George, H.A., Rosolowsky, M., Fife, K.H., and Jansen, K.U. (1995). Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 209, 506-518.
- Hsueh, P.R. (2009). Human papillomavirus, genital warts, and vaccines. *J Microbiol Immunol Infect* 42, 101-106.

Jacobs, N., Renard, I., Al-Saleh, W., Hubert, P., Doyen, J., Kedzia, W., Boniver, J., and Delvenne, P. (2003). Distinct T cell subsets and cytokine production in cultures derived from transformation zone and squamous intraepithelial lesion biopsies of the uterine cervix. *Am J Reprod Immunol* 49, 6-13.

Janeway C.A., T.P., Walport M., Shlomchik M.J. (2001). *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 5th edition edn (Garland Publishing).

Kabelitz, D., Wesch, D., and He, W. (2007). Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer Res* 67, 5-8.

Kang, S.H., Won, K., Chung, H.W., Jong, H.S., Song, Y.S., Kim, S.J., Bang, Y.J., and Kim, N.K. (1998). Genetic integrity of transforming growth factor beta (TGF-beta) receptors in cervical carcinoma cell lines: loss of growth sensitivity but conserved transcriptional response to TGF-beta. *Int J Cancer* 77, 620-625.

Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T. (1998). In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids. *J Virol* 72, 10298-10300.

Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12180-12184.

Kurman, R.J., Malkasian, G.D., Jr., Sedlis, A., and Solomon, D. (1991). From Papanicolaou to Bethesda: the rationale for a new cervical cytologic classification. *Obstet Gynecol* 77, 779-782.

Lacey, J.V., Jr., Brinton, L.A., Abbas, F.M., Barnes, W.A., Gravitt, P.E., Greenberg, M.D., Greene, S.M., Hadjimichael, O.C., McGowan, L., Mortel, R., *et al.* (1999). Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8, 1079-1085.

Lanier, L.L., Phillips, J.H., Hackett, J., Jr., Tutt, M., and Kumar, V. (1986). Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 137, 2735-2739.

Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M., and Geraghty, D.E. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5199-5204.

Liu, Z., Eltoun, I.E., Guo, B., Beck, B.H., Cloud, G.A., and Lopez, R.D. (2008). Protective immunosurveillance and therapeutic antitumor activity of gammadelta T cells demonstrated in a mouse model of prostate cancer. *J Immunol* 180, 6044-6053.

Luci, C., and Tomasello, E. (2008). Natural killer cells: detectors of stress. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2335-2340.

Motoyama, S., Ladines-Llave, C.A., Luis Villanueva, S., and Maruo, T. (2004). The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 50, 9-19.

- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., and Meijer, C.J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348, 518-527.
- Munoz, N., Franceschi, S., Bosetti, C., Moreno, V., Herrero, R., Smith, J.S., Shah, K.V., Meijer, C.J., and Bosch, F.X. (2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359, 1093-1101.
- Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 5, 201-214.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.
- Pattillo, R.A., Husa, R.O., Story, M.T., Ruckert, A.C., Shalaby, M.R., and Mattingly, R.F. (1977). Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* 196, 1456-1458.
- Pende, D., Cantoni, C., Rivera, P., Vitale, M., Castriconi, R., Marcenaro, S., Nanni, M., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, A., and Moretta, L. (2001). Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 31, 1076-1086.
- Prokopczyk, B., Cox, J.E., Hoffmann, D., and Waggoner, S.E. (1997). Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* 89, 868-873.
- Quah, B.J., Warren, H.S., and Parish, C.R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2, 2049-2056.
- Sanchez, M.J., Muench, M.O., Roncarolo, M.G., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1994). Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* 180, 569-576.
- Stanley, M., Lowy, D.R., and Frazer, I. (2006). Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/106-113.
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., and Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189, 12-19.
- Walzer, T., Blery, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S.H., Jaeger, S., Andre, P., Gauthier, L., Daniel, L., *et al.* (2007). Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3384-3389.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730-732.

Yamamoto, K., Fujiyama, Y., Andoh, A., Bamba, T., and Okabe, H. (2001). Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta* 1526, 10-12.

Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C.C., Schlegel, R., and Howley, P.M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 119, 361-366.

Yokoyama, W.M., and Plougastel, B.F. (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 3, 304-316.

zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92, 690-698.

zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2, 342-350.