

PRIX POSTERS

SFI/IMMUNID

Lors de son dernier congrès annuel 2010 à Marseille, la SFI et la société ImmunID ont décernés trois «**Prix meilleur poster**», d'un montant de 500 € chacun, à : **Sandrine Luce** «*Gènes co-exprimés par les cellules T CD8+ spécifiques de peptides de l'insuline chez les patients atteints de diabète de type 1*», **Delphine Sauce** «*La progression dans la pathologie VIH est associée à un épuisement de la lymphopoïèse amplifiée par l'activation immunitaire persistante sous-jacente*» et **Javier Celis-Gutierrez** «*Adaptateurs ou acteurs de l'encodage du signal NK*», .

GENES CO-EXPRIMÉS PAR LES CELLULES T CD8+ SPECIFIQUES DE PEPTIDES DE L'INSULINE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE DIABETE DE TYPE 1

Luce Sandrine
Christian Boitard
Inserm U986
Hôpital Saint Vincent de Paul
Paris

sandrine.luce@inserm.fr

Le diabète de type 1 (DT1), ou diabète auto-immun, est une pathologie multifactorielle à composante multigénique et environnementale. C'est une maladie auto-immune caractérisée par le développement d'un infiltrat lymphocytaire dans le pancréas (insulite) dont les principaux constituants sont, chez l'homme, des cellules T CD8+ productrices d'IFN γ , soulignant le rôle important de ces cellules dans la physiopathologie de la maladie (1), et par la destruction progressive des cellules β pancréatiques productrices d'insuline. On détecte chez les patients des cellules T et des auto-anticorps dirigés contre les auto-antigènes insulaires dont l'insuline, qui semble jouer un rôle important dans le déclenchement de l'auto-immunité,

mais aussi la Glutamate décarboxylase (GAD) et les protéines de type tyrosine phosphatase (IA-2) (2). L'insuline est secrétée sous la forme d'un précurseur, la préproinsuline (PPI), qui est ensuite clivée en proinsuline (PI) puis convertie en insuline mature et en peptide C, secrétés de façon équimolaire. Des résultats antérieurs du laboratoire ont permis d'identifier des peptides spécifiques de la PI (3) et de la PPI (4) comme étant capables d'induire une sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T périphériques de patients DT1 en ELISpot. Par ailleurs, il a été démontré que certains peptides spécifiques de la PPI ont un pouvoir immunogène. La définition des peptides reconnus a permis la fabrication de tétramères (TMr) et la détection de cellules T CD8+ spécifiques de la PPI dans le sang périphérique de patients DT1, indiquant l'importance de la PPI dans le développement du DT1 (4).

Détection de cellules T CD8+ spécifiques de la PPI et de l'insuline chez les patients DT1.

Par immunologie inverse, nous avons identifié un certain nombre de peptides spécifiques de la séquence de la PPI, restreints pour la molécule HLA-A*0201. Les peptides donnant les meilleurs scores dans les banques de données Bimas et SYFPEITHY ont tous été testés pour leur affinité de liaison envers la molécule HLA-A*0201 sur des cellules déficientes en molécule TAP exprimant la molécule HLA-A*0201, condition nécessaire à la réalisation des TMr (5). Nous avons établi une banque de huit TMr/HLA-A*0201 spécifiques de la PPI que nous avons utilisé pour cribler les lymphocytes T périphériques de patients DT1. Ont été utilisés comme témoins un TMr incluant un peptide du virus CMV (contrôle positif) et un TMr incluant un peptide de la pyruvate déshydrogénase (contrôle négatif). Cette étude a été réalisée sur une cohorte composée de 25 patients DT1 récents, 24 patients DT1 anciens, 21 contrôles sains mais aussi 14 patients DT2 (contrôles de l'effet de l'hyperglycémie) dont la moitié sont traités par insuline thérapeutique (contrôles de l'effet de l'apport d'insuline exogène). L'utilisation de ces tétramères a permis de détecter des cellules T CD8+ spécifiques de la PPI chez les patients DT1 récents et anciens, avec des différences hautement significatives par rapport aux témoins pour trois peptides : les peptides 6-14

et 15-24 qui sont localisés dans la séquence signal de la PPI, et le peptide 33-42 qui lui est localisé dans la chaîne B de l'insuline et est préférentiellement retrouvé chez les patients ayant un diabète de longue durée – les premiers sont absents de l'insuline injectée aux patients, contrairement au peptide localisé dans la chaîne B.

Les cellules T CD8+ spécifiques de la PPI ont un phénotype de cellules T mémoires centrales.

Nous avons ensuite caractérisé phénotypiquement les cellules T CD8+ spécifiques de la PPI ainsi que les cellules T CD8+ spécifiques du CMV. Pour cette caractérisation phénotypique, nous avons utilisé les marqueurs CD45RA et CCR7 qui permettent de discriminer les cellules T naïves (TN) CD45RA+CCR7+, les cellules T mémoires centrales (TCM) CD45RA-CCR7+, les cellules T mémoires effectrices (TEM) CD45RA-CCR7- et enfin les cellules T mémoires effectrices terminales (TEMRA) CD45RA+CCR7- (6). La caractérisation des cellules T CD8+ spécifiques de l'infection virale au CMV montre un phénotype de cellules TEM et TEMRA, caractéristique des cellules T CD8+ au cours de nombreuses infections virales (6,7). En revanche, la caractérisation phénotypique des cellules T CD8+ spécifiques de la PPI chez les patients DT1 récents et anciens montre un phénotype de cellules T mémoires centrales et de cellules T naïves, aussi bien pour les cellules T spécifiques des peptides de la séquence signal que du peptide de la chaîne B.

Les cellules T CD8+ spécifiques de la PPI ont un programme d'expression de gènes apparenté à celui de cellules T CD8+ mémoires centrales.

Nous avons ensuite regardé les niveaux de co-expression de 18 gènes impliqués dans la réponse immunitaire des cellules T CD8+ spécifiques de la PPI sur cellule unique (7,8). D'une manière générale, nous avons observé une diminution significative de l'expression des gènes de cytotoxicité par les cellules T CD8+ spécifiques de la PPI par rapport aux cellules T CD8+ du CMV. En revanche, nous avons une augmentation significative de l'expression du gène *Ccr7* par les cellules T CD8+ spécifiques de la PPI par rapport à ce que nous observons pour les cellules T CD8+ spécifiques du CMV. De même, on observe une

expression des gènes *Ifng*, *Ccl5* et *Il10r* équivalente dans les deux types de populations, confirmant le phénotype de cellules mémoires T CD8+ centrales des cellules auto-réactives des patients DT1. En parallèle, la détection chez un contrôle sain d'un pourcentage significatif de cellules T CD8+ TMR+ spécifiques du peptide 6-14, chez lequel il n'a pas été détecté d'auto-anticorps anti-insuline, anti-GAD ou anti-IA2, a fait l'objet d'une étude similaire à celle effectuée chez les patients DT1. Cela a permis de mettre en évidence un profil identique à celui observé pour les cellules T CD8+ auto-réactives des patients DT1 à l'exception de l'expression par un pourcentage hautement significatif de cellules du gène de *Il10*, suggérant que les cellules de ce témoin sont capables de réguler la réponse auto-immune dans le sens d'une protection.

Conclusion.

La détection de cellules T CD8+ spécifiques de la PPI chez les patients DT1 confirme l'importance de la PPI comme auto-antigène du DT1. Leur détection chez les patients DT1 anciens suggère que ces patients demeurent exposés à l'auto-antigène malgré la réduction drastique attendue de la masse de cellules β . Une première hypothèse postule la présence de cellules β résiduelles chez ce type de patients. Néanmoins, la détection préférentielle de cellules T CD8+ spécifiques du peptide situé dans la chaîne B de l'insuline chez les patients DT1 anciens suggère un rôle possible du traitement par l'insuline exogène sur la réponse immunitaire chez les patients ayant un diabète ancien. Le phénotype des cellules T CD8+ spécifiques de la PPI suggère un profil de cellules T mémoires centrales et de cellules T naïves. Le profil de co-expression de gènes impliqués des cellules T CD8+ autoréactives chez les patients DT1 confirme ce phénotype de cellules mémoires centrales. L'expression d'un phénotype de cellules mémoire centrale des cellules T CD8+ autoréactives chez les patients DT1 indique qu'il s'agit de cellules recirculant dans les organes lymphoïdes secondaires (9). d'une part mais également capables de s'activer de façon rapide lors d'une ré-exposition massive aux autoantigènes (10).

Ainsi de nombreux patients atteints de DT1 montrent une expansion de cellules T CD8+ spécifiques de la PPI

exprimant un phénotype proche de celui de cellules T mémoires centrales, non retrouvé chez les contrôles, soulignant le rôle important de la PPI dans le développement du DT1. Le DT1 est caractérisé par une phase pré-diabétique plus ou moins longue correspondant essentiellement au développement de l'auto-immunité et à la destruction des cellules sécrétant l'insuline. Nos observations suggérant la contribution de l'injection d'insuline exogène sur l'expansion de cellules T CD8+ auto-réactives chez les patients ayant un diabète ancien apporte un élément nouveau de l'histoire naturelle de la maladie. Par ailleurs, ces données apportent de nouveaux outils diagnostiques dans le DT1.

REFERENCES

1. Conrad B et al 1994. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* 371:283-284.
2. Thébault-Baumont K et al 2003. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest* 111:851-857.
3. Toma A et al 2005. Recognition of a subregion of human proinsulin by class I-restricted T cells in type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10581-10586.
4. Toma A et al 2009. Recognition of human proinsulin leader sequence by class I-restricted T-cells in HLA-A*0201 transgenic mice and in human type 1 diabetes. *Diabetes* 58:394-402.
5. Gannagé M et al 2005. Ex vivo characterization of multi-epitopic tumor-specific CD8 T cells in patients with chronic myeloid leukemia: implications for vaccine development and adoptive cellular immunotherapy. *J Immunol* 174:8210-8218.
6. Romeröet al 2007. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 178:3566-3574.
7. Peixoto A et al 2007. CD8 single-cell gene coexpression reveals three different effector types present at distinct phases of the immune response. *J Exp Med* 204:1193-1205.
8. Peixoto A et al 2004. Quantification of multiple gene expression in individual cells. *Genome Res* 14:1938-1947.
9. Jameson SC and Masopust D 2009. Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* 31:859-871.
10. Champagneet al 2001. Learning to remember: generation and maintenance of T-cell memory. *DNA Cell Biol* 20:745-760.

MODULATION DU DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES B PAR LES OSTEOCLASTES

Anna Mansour
Abdelilah Wakkach
Claudine Blin-Wakkach

Inserm U576
**Université de Nice Sophia-
Antipolis**
Nice

anna.mansour@wanadoo.fr
wakkach@unice.fr
blin@unice.fr

Interactions ostéoimmunologiques et différenciation des lymphocytes B

Pendant de nombreuses années, l'étude du système osseux et l'étude du système immunitaire ont été réalisées de façon indépendante et les interactions pouvant exister entre ces deux systèmes n'ont pas toujours été appréciées. Dans un article intitulé «Bone versus immune system» (1), Arron et Choi ont proposé le terme d'«ostéoimmunologie» pour décrire un nouveau champ interdisciplinaire entre la biologie de l'os et l'immunologie. Ce concept est né de l'émergence de plusieurs travaux portant sur les relations entre l'os et le système immunitaire.

Les interactions ostéoimmunologiques sont essentielles non seulement à la différenciation des cellules immunitaires dans la moelle osseuse mais aussi à l'activité des cellules osseuses dans le cadre physiologique ou pathologique. En particulier, dans la moelle osseuse, le processus de maintien ou de différenciation des cellules souches hématopoïétiques est étroitement contrôlé par les cellules stromales et les ostéoblastes, cellules productrices de la matrice osseuse, via des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion (2). Un rôle similaire des ostéoblastes et des cellules stromales a été démontré dans la différenciation des lymphocytes B (3,4).

Le développement des lymphocytes B est un processus hautement régulé et différents stades de ce développement ont été définis selon l'expression phénotypique de marqueurs de surface particuliers (5). Les cellules B les plus précoces sont les cellules prépro-B qui se différencient en cellules pro-B puis pré-B et enfin en cellules B immatures qui quittent la moelle osseuse pour finir leur maturation dans les organes lymphoïdes secondaires. Ce processus de différenciation est dépendant d'une interaction étroite avec les ostéoblastes et les cellules stromales et l'ablation de ces cellules affecte la lymphopoïèse B (3,4). Cette interaction implique des facteurs de croissance, des chimiokines et leurs récepteurs, parmi lesquelles les plus importantes sont CXCL12 et IL-7. Elles définissent des niches successives utilisées par les cellules B au cours de leur différenciation : les précurseurs B les plus précoces interagissent avec des cellules stromales qui expriment CXCL12 puis les cellules pro-B se localisent

à proximité de cellules exprimant IL-7 puis deviennent indépendantes vis-à-vis de ces cellules à partir du stade pré-B et migrent vers la rate au stade de cellules B immatures (3). Après leur maturation, les cellules B continuent leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Ces plasmocytes recolonisent la moelle osseuse après avoir été générés dans les organes lymphoïdes secondaires, et sont maintenus dans une niche plasmocytaire constituée de cellules stromales CXCL12+ (6). Ces études révèlent le rôle joué par les différentes niches stromales médullaires au cours de ces étapes de différenciation et donc l'importance d'une organisation spatiale fine et d'une régulation étroite des interactions cellulaires. Ainsi, il est évident que les altérations du microenvironnement osseux affectent la lymphopoïèse B.

Contrôle de la différenciation des lymphocytes B par les ostéoclastes

L'homéostasie osseuse résulte d'un équilibre finement régulé entre la biosynthèse de la matrice osseuse par les ostéoblastes et sa résorption par les ostéoclastes. Les déséquilibres de l'activité de ces cellules engendrent des perturbations au niveau de l'architecture de l'os, telles celles observées dans l'ostéopétrose, une pathologie caractérisée par une absence de résorption osseuse induisant une augmentation de la densité osseuse et une altération sévère du microenvironnement osseux. Notre équipe s'est intéressée à l'ostéoimmunologie en étudiant le phénotype immunitaire de la souris ostéopétrotique oc/oc, mutant spontané portant une délétion du gène *Tc1g1* codant l'isoforme $\alpha 3$ de l'ATPase vacuolaire. Cette protéine est nécessaire au phénomène d'acidification indispensable à la résorption osseuse. La souris oc/oc possède donc des ostéoclastes totalement différenciés mais inactifs, ce qui entraîne une réduction très importante de l'espace médullaire et des perturbations dans les interactions cellulaires (7). Nos travaux ont montré que chez la souris oc/oc, la différenciation des lymphocytes B est altérée, avec un blocage de la transition entre cellules pro-B et cellules pré-B qui conduit à une diminution du nombre de lymphocytes B (7). Par contre, la différenciation des lymphocytes B est normale in vitro (8) et un blocage de cette différenciation

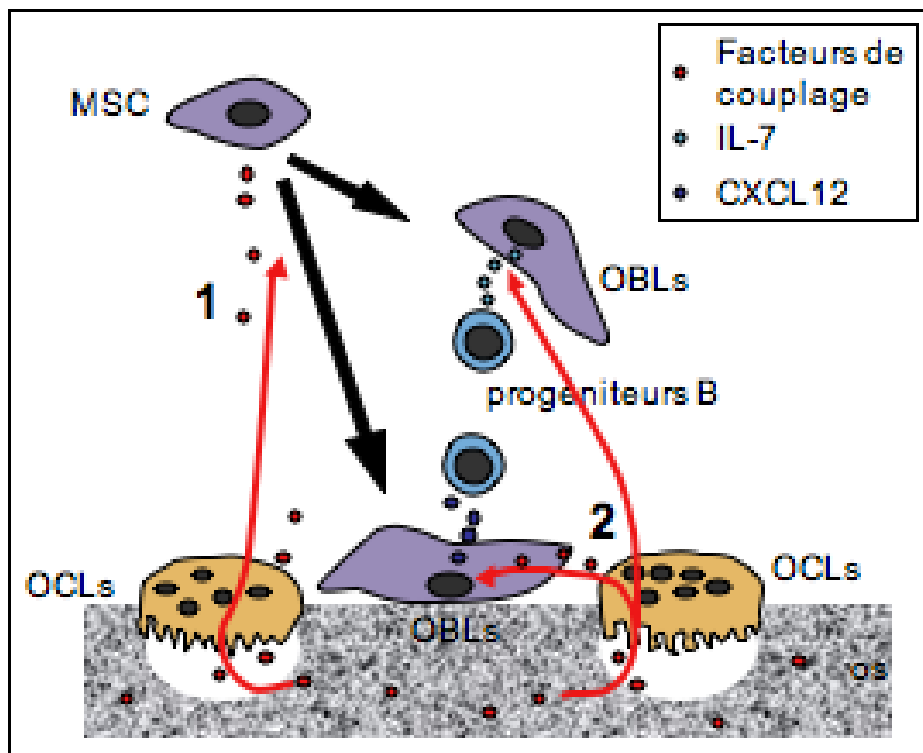


Figure 1 : mécanisme de contrôle des niches des cellules B par les ostéoclastes
 En résorbant la matrice osseuse, les ostéoclastes (OCLs) libèrent des facteurs de couplage stockés dans cette matrice. (1) Ces facteurs sont connus pour induire la différenciation des cellules souches mésenchymateuse (MSCs) en ostéoblastes, composants essentiels des niches des progéniteurs B. La baisse de résorption osseuse diminue donc la libération de ces facteurs et l'engagement ostéoblastique. (2) Nos résultats suggèrent également que les facteurs de couplages pourraient augmenter l'expression de CXCL12 et d'IL-7 par les cellules ostéoblastiques. La baisse d'activité des ostéoclastes (OCLs) entraînerait donc la diminution de l'expression de ces facteurs. Globalement, la réduction de la résorption osseuse affecte donc les niches des cellules B dans la moelle osseuse, conduisant à une relocalisation des progéniteurs B vers la rate.

est observé vivo dans d'autres modèles murins d'ostéopétrose (RANK^{-/-}, RANK-L^{-/-} p50/p52^{-/-}, TRAF6^{-/-}, op/op, mi/mi, et Fos^{-/-}). Bien que certains des gènes mutés dans ces modèles soient impliqués dans le développement des cellules B, l'association systématique entre ostéopétrose et diminution de la lymphopoïèse B suggèrent que cette diminution implique également l'absence d'activité des ostéoclastes. Cette hypothèse est confortée par le fait que, chez la souris oc/oc, le niveau d'expression de l'IL-7 est très fortement réduit dans la moelle osseuse et que la lymphopoïèse B y est partiellement restaurée par injection d'IL-7 (9). L'activité ostéoclastique semble donc un facteur important dans le contrôle du développement des cellules B.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons restauré, chez la souris oc/oc, l'activité des ostéoclastes par transfert de cellules dendritiques spléniques CD11c+MHC-II+ purifiée à partir de la rate de souris+/+ après déplétion des lymphocytes B. Ce transfert entraîne la différenciation in vivo des cellules dendritiques en

ostéoclastes fonctionnels, et permet donc de retrouver une activité de résorption osseuse, sans avoir transféré de précurseurs hématopoïétiques qui pourraient contenir des précurseurs de la lignée B (10). La reprise de résorption osseuse est associée à une correction partielle de l'architecture osseuse et de la lymphopoïèse B qui redevient équivalente à celle observée chez la souris+/+ (11). Nos résultats démontrent donc clairement un lien entre l'activité ostéoclastique et la lymphopoïèse B. Cependant, l'utilisation du modèle oc/oc restant limitée par la faible espérance de vie des animaux (< 21 jours) et par la faible cellularité de la moelle (< 1.10⁶ cellules), nous avons donc choisi de poursuivre cette analyse dans un autre modèle. Pour cela, nous avons développé un modèle d'ostéopétrose induite par l'injection d'un puissant inhibiteur de l'activité ostéoclastique, l'acide zolédronique (ZA). Après 6 semaines de traitement, ce protocole induit le développement d'ostéopétrose modérée due à une baisse de l'activité des ostéoclastes (11). Cette réduction de l'activité des ostéoclastes induit une

diminution du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse à partir du stade prépro-B, mais n'affecte pas la différenciation monocyttaire (11). Cette diminution de la différenciation des lymphocytes B s'accompagne d'une forte réduction de l'expression d'IL-7 et de CXCL12 par les cellules stromales de la moelle osseuse des souris traitées. Nous avons vérifié in vitro que le ZA n'affecte pas directement la différenciation, la prolifération et l'apoptose des précurseurs B. Nous avons également vérifié que le ZA n'affecte pas directement l'expression de CXCL12 et d'IL-7 dans les cellules stromales, que ce soit en présence ou en absence d'ostéoclastes, dans un système de coculture sans résorption osseuse (11). L'ensemble de ces données indique que l'effet du ZA sur la lymphopoïèse B est lié au blocage de la résorption osseuse.

Enfin, nous avons également montré que la diminution de la lymphopoïèse B dans la moelle osseuse est compensée dans la rate par une augmentation des progéniteurs B. L'analyse de la domiciliation de ces progéniteurs marqués par la GFP a mis en évidence un défaut de domiciliation des cellules B dans la moelle osseuse des souris traitées et au contraire une augmentation de leur rétention dans la rate chez la souris traitée au ZA par rapport aux contrôles (11). Ces données suggèrent que l'environnement médullaire en absence de résorption osseuse ne favorise pas rétention des progéniteurs B dans la moelle osseuse.

Les ostéoblastes sont impliqués dans les niches des progéniteurs B et produisent IL-7 et CXCL12. De plus, ils fonctionnent de façon coordonnée avec les ostéoclastes au sein d'une unité de modelage. Dans phénomène appelé couplage, la modification d'activité d'une de ces cellules affecte l'activité de l'autre type cellulaire (12). Nous avons donc analysé les conséquences de la diminution de l'activité ostéoclastique sur la différenciation ostéoblastique, chez les souris traitées au ZA. Nos résultats montrent une diminution de 50% du nombre de colony-forming unit-alkaline phosphatase (CFU-ALP) représentatives des progéniteurs ostéoblastiques dans la moelle des souris traitées par rapport aux contrôles. Nous avons confirmé cette diminution du nombre de cellules ostéoblastiques par analyse histologique et par

analyse de l'expression des principaux marqueurs ostéoblastiques (Runx-2, ostéocalcine, bone sialoprotéine et collagène-1- α 1) dans les cellules stromales des souris traitées (11). De façon intéressante, nous avons trouvé le même résultat dans la moelle osseuse chez la souris oc/oc (11) ce qui confirme donc que la réduction de l'engagement des ostéoblastes est bien une conséquence de la modification de l'activité ostéoclastique

Conclusion et perspectives

L'ensemble de ces données montre pour la première fois que les ostéoclastes modulent le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse. Cette modulation passe par le contrôle de l'engagement ostéoblastique et de l'expression d'IL-7 et de CXCL12 (figure 1). Nos résultats montrent que la seule présence d'ostéoclastes ne suffit pas à assurer le maintien de la niche des lymphocytes B. Il implique donc vraisemblablement des facteurs diffusibles produits pendant la résorption osseuse tels que TGF- β , BMPs et IGF-II qui sont libérés de la matrice osseuse pendant la résorption et qui sont connus pour induire la différenciation ostéoblastique permettant l'équilibre en formation et résorption osseuse (12) (figure 1). Il est également possible que ces facteurs de couplage modulent l'expression d'IL-7 et de CXCL12 par les cellules de la niche (figure 1).

Jusqu'à présent, les interactions entre ostéoclastes et ostéoblastes étaient connues pour réguler la différenciation et la fonction de ces cellules pour assurer l'équilibre entre formation et résorption osseuse. Nos données étendent les conséquences de ces interactions au maintien de l'intégrité des niches des cellules B. Ce travail ouvre donc de nouvelles perspectives pour l'étude des niches des lymphocytes B dans la moelle osseuse, ainsi que sur les mécanismes de la rétention des progéniteurs B dans leur niche.

REFERENCES

1. Arron J & Choi Y 2000. Bone versus immune system. *Nature* 408:535-536.
2. Adams GB & Scadden DT 2006. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 7:333-337.
3. Tokoyoda K et al 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20:707-718.
4. Zhu J et al 2007. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 109:3706-3712.
5. Hardy RR & Hayakawa K 2001. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19:595-621.
6. Radbruch A et al 2006. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews* 6:741-750.
7. Blin-Wakkach C et al 2004. Hematological defects in the oc/oc mouse, a model of infantile malignant osteopetrosis. *Leukemia* 18:1505-1511.
8. Blin-Wakkach C et al 2004. Characterization of a novel bipotent hematopoietic progenitor population in normal and osteopetrotic mouse. *J Bone Miner Res* 7:1137-1143.
9. Blin-Wakkach C, Wakkach A, Quincey D, Carle GF. Interleukin-7 partially rescues B-lymphopoiesis in osteopetrotic oc/oc mice through the engagement of B220+CD11b+ progenitors. *Exp Hematol* 2006;34 :851-859.
10. Wakkach A et al 2008. Bone marrow microenvironment controls the in vivo differentiation of murine dendritic cells into osteoclasts. *Blood* 112:5074-5083.
11. Mansour A et al 2011. Osteoclast activity modulates B cell development in the bone marrow. *Cell Research*, Sous presse.
12. Matsuo K & Irie N 2008. Osteoclast-osteoblast communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473:201-209.

LA PROGRESSION DANS LA PATHOLOGIE VIH EST ASSOCIÉE À UN ÉPUISEMENT DE LA LYMPHOPOÏÈSE AMPLIFIÉE PAR L'ACTIVATION IMMUNITAIRE PERSISTANTE SOUS- JACENTE

Delphine Sauce

**Inserm UMR S945
Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris**

Delphine.Sauce@upmc.fr

Le vieillissement physiologique et l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) présentent de nombreuses caractéristiques immunologiques communes évocatrices du développement d'une immunosénescence précoce chez les patients infectés par le VIH, même si une démonstration rigoureuse est toujours manquante (1-7). Afin d'explorer la relation potentielle entre immunosénescence et progression vers le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), et ainsi disséquer davantage la pathogénèse du HIV, nous avons effectué une analyse multi-paramétrique de marqueurs immunologiques (compte cellulaire, phénotypage des sous-populations lymphocytaires T circulantes, réponses fonctionnelles à diverses stimulations antigéniques) en comparant des personnes âgées de plus de 75 ans à des patients séropositifs pour le VIH-1 âgés entre 25-55 ans (n=280). Une fréquence réduite de lymphocytes T CD4+ et CD8+, ainsi que des lymphocytes B et cellules NK, observée au sein de ces cohortes, a attiré notre attention sur la seule source commune permettant de dériver l'ensemble de ces sous-types cellulaires : le compartiment des progéniteurs hématopoïétiques. Nous avons ainsi étudié les cellules CD34+ directement isolées du sang circulant ; ceci nous a permis de caractériser leur nombre, leur potentiel clonogénique

(mise en culture et test de prolifération «Colony-Forming Unit») et leur phénotype (polarisation lymphoïde vs myéloïde).

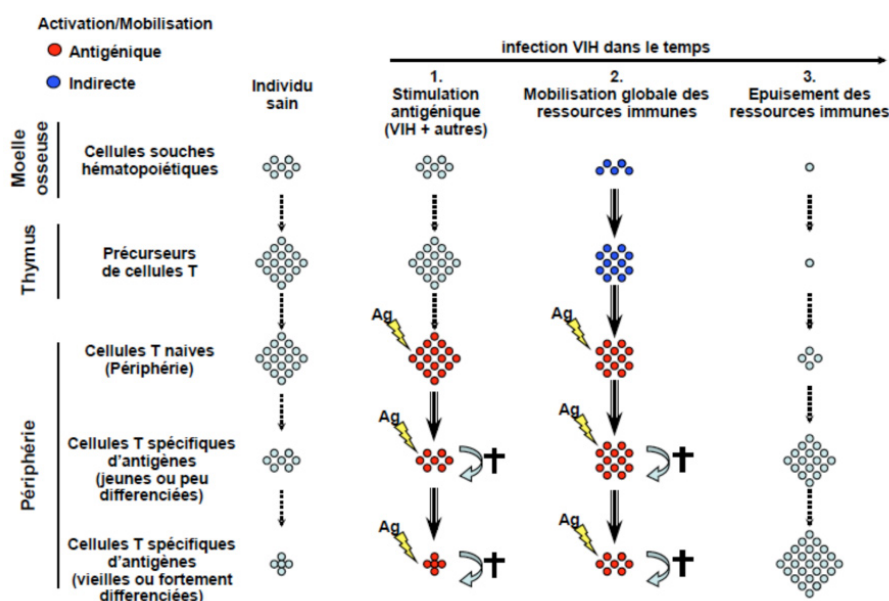
Nos résultats indiquent que la progression vers le SIDA, indiquée par un déclin du compte de lymphocytes T CD4+ est directement associée à un déficit de la lymphopoïèse. Les caractéristiques retrouvées au sein des cellules CD34+, aussi bien au niveau phénotypique que fonctionnel, soulignent un défaut profond des ressources hématopoïétiques associé à la progression vers la maladie. Nous avons observé que le nombre de cellules CD34+ et que leur ratio lymphoïde/myéloïde diminuaient chez les patients «progressseurs» ; nous avons également démontré que leur capacité à générer des colonies «blanches» (CFU-M, CFU-GM, GFU-G et CFU-GEMM) était fortement réduite lors de la progression. Une analyse multi-variée révèle que le niveau des cellules CD34+ représente un facteur indépendant prédictif du compte CD4 ($P < 0,0001$). De plus, ces dommages lymphopoïétiques chez les patients VIH non traités sont corrélés de façon positive au niveau d'activation immunitaire systémique ($P < 0,0001$, $r = 0,51$).

Ces altérations peuvent être partiellement limitées sous traitement anti-rétroviral. En effet, chez les patients traités, les patients présentant des cellules CD34+ de qualité, en nombre et en capacité à se différencier en

cellules lymphoïdes, sont ceux et celles pour lesquels la reconstitution sous traitement est la meilleure, démontrée par une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4+, T CD8+, NK et B circulants, et une normalisation du ratio CD4/CD8. Cependant, l'échec de reconstitution sous traitement (pas d'augmentation du nombre de cellules CD4+ circulantes) en dépit du succès virologique (charge virale indétectable) est lié aux altérations persistantes et profondes du système hématopoïétique, altérations également observées dans la cohorte contrôle d'individus sains âgés.

Ce travail apporte un nouveau regard sur les conséquences d'une activation chronique persistante lors de l'infection chronique à VIH et démontre le rôle clé des ressources hématopoïétiques dans le devenir des patients infectés. Ainsi, il est important que les progéniteurs lymphopoïétiques soient préservés afin d'augmenter les chances de réponse au traitement et ainsi retarder la survenue d'une immunosénescence précoce chez ces patients.

Epuisement/vieillesse globale: Altération de l'homéostasie à la suite d'un épauement immunitaire généralisé



Représentation schématique de notre hypothèse selon laquelle l'activation immunitaire lors d'une infection chronique par le VIH-1 conduit à une mobilisation globale des progéniteurs hématopoïétiques, ceci afin d'assurer le maintien suffisant d'un pool périphérique de cellules naïves et de cellules mémoires/effectrices circulantes.

REFERENCES

1. McMichael AJ et al 2000. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:363-367.
2. Appay V et al 2002. *Nat Med* 8:379-385.
3. Appay V et al 2000. *J Exp Med* 192:63-75.
4. Appay V et al 2002. *J Immunol* 168:3660-3666.
5. Appay V et al 2002. *Trends Immunol* 23:580-585.
6. Papagno L et al 2004. *PLoS Biol* 2:E20.
7. Pawelec G et al 2005. *Immunol Rev* 205:257-268.

ADAPTATEURS OU ACTEURS DE L'ENCODAGE DU SIGNAL NK

Javier Celis-Gutierrez
Emilie Coppin
Jacques A. Nunès

Centre de Recherche en
Cancérologie de Marseille
Inserm U891, Institut Paoli-
Calmettes

javier.celis-gutierrez@inserm.fr

Les cellules natural killer (NK) acquièrent leur licence pour tuer, elles ont la capacité d'éliminer directement des cellules tumorales ou cellules infectées par des virus, parasites. L'activation des cellules NK est régulée par l'engagement d'une panoplie de récepteurs inhibiteurs et activateurs avec leurs ligands respectifs exprimés à la surface de cellules cibles. A l'interface entre cellules NK et cellules cibles, de nombreuses protéines se concentrent pour former une synapse immunologique. L'intégration des signaux provenant des récepteurs activateurs et inhibiteurs à la synapse permet d'induire une réponse effectrice appropriée (1). Les signaux émanant de ces différents récepteurs déterminent le répertoire NK dans le développement des cellules NK et régulent donc les fonctions NK telles que la cytotoxicité et la production d'interféron- γ (IFN- γ) et d'autres médiateurs de l'inflammation dans les cellules NK matures.

Signal NK, une balance entre kinases et phosphatases.

Les cellules NK représentent un fantastique modèle cellulaire pour étudier les événements de signalisation intracellulaire induits lors d'un message activateur versus inhibiteur. Cette balance peut facilement se traduire par un recrutement différentiel d'enzymes impliquées dans la phosphorylation de protéines intracellulaires. En 1992, Edmond H. Fischer et Edwin G. Krebs ont été récompensés pour leurs contributions fondamentales à la théorie qu'un signal extracellulaire est transmis à l'intérieur de la cellule par un encodage faisant intervenir le transfert de groupements phosphates sur des protéines. Le Prix Nobel de médecine 1992 a été remis conjointement à ces deux chercheurs, pour leurs découvertes concernant la phosphorylation réversible des protéines comme un mécanisme biologique de régulation. Ces mécanismes de phosphorylations / dé-phosphorylations ont permis de connecter plusieurs acteurs de la signalisation intracellulaire aux fonctions principales de cellules NK. Sur cette base, une carte du réseau de signalisation NK a pu être proposée en 2004 (2). Pour plus de détails cette carte est accessible sur le site internet de la revue Science Signaling (Natural Killer Cell Receptor Signaling Pathway. Frédéric Vély, Eric O Long, Jacques A Nunès and Eric

Vivier. Sci. Signal. (Connections Map Pathway), http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm;CMP_13625).

En bref, la formation de la synapse immunologique NK orchestre des regroupements de récepteurs membranaires, permettant le contact entre des protéines tyrosine kinases (PTKs) intracellulaires de la famille Src (en particulier Lck et Fyn) et les parties intracytoplasmiques des récepteurs inhibiteurs (CD94/NKG2A...). Les récepteurs inhibiteurs sont phosphorylés sur résidus tyrosine au niveau des motifs immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIMs : I/S/T/LxYxxL/V où x correspond à un acide aminé quelconque) et recrutent directement des protéines tyrosine phosphatases, SHP-1 et SHP-2. Si l'encodage du signal inhibiteur est dépendant de tyrosine phosphatases, il était évident que les signaux activateurs devaient employer des PTKs. Les cellules NK murines dépourvues des gènes codant pour les PTKs de la famille Syk, présentent des défauts de l'ADCC (antibody-dependent cell cytotoxicity) et production de cytokines (3). Ces PTKs sont recrutées à la membrane plasmique au niveau de protéines transmembranaires contenant des motifs immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs : YxxL/Ix6-8YxxL/I). Les récepteurs activateurs (CD16, NCRs...) ne possèdent pas ce type de motifs ITAMs. C'est à ce niveau que commencent à intervenir des molécules adaptatrices dans le schéma de signalisation NK. Il était connu dans d'autres types cellulaires que des protéines transmembranaires contenant des motifs ITAMs, CD3z et Fc γ permettaient de connecter les PTKs de la famille Syk au récepteur de faible affinité pour les IgG, CD16 (Fc γ RIIIA). Ce mode d'association se vérifie dans les cellules NK et a permis de découvrir également des nouveaux adaptateurs qui ont donc été identifiés en particulier dans les cellules NK : DAP-12 (DNAX-activating protein of 12 kDa, aussi appelée KARAP, killer cell-activating receptor-associated protein) qui contient un motif ITAM et s'associe aux récepteurs activateurs. Par ces approches, le groupe de recherche de DNAX a pu identifier une autre molécule adaptatrice transmembranaire, DAP-10 (DNAX-activating protein of 10 kDa) qui s'associe à un récepteur activateur, NKG2D. Cette molécule adaptatrice ne contient pas de motif ITAM, mais possède un motif YxNM qui a la

particularité de fixer sur le même site différentes molécules impliquées dans la transmission du signal, p85a (sous-unité régulatrice des PI3K de classe IA) et les protéines adaptatrices de type Grb2. Cette molécule adaptatrice, DAP-10 permet donc de relier un récepteur activateur à une activité lipide kinase, PI3K et à un réseau de protéines à activité GTPasique (Rac et dynamine) impliquées dans le réarrangement du cytosquelette d'actine. En somme, les récepteurs inhibiteurs s'associent à des phosphatases et les récepteurs activateurs par le biais d'adaptateurs, recrutent des kinases (pour revue, réf. 2).

Substrats de PTKs, adaptateurs et signal NK : données récentes.

Parmi les substrats de PTKs étiquetés molécules adaptatrices, LAT, SLP-76 ou 3BP2, ont trouvé une probable localisation dans les cartes de signalisation NK (http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm;CMP_13625). Plus

réemment, d'autres adaptateurs ont été décrits dans les cellules NK, la molécule BCAP (B-cell adaptor for phosphatidylinositol 3-kinase) peut être phosphorylée sur résidu tyrosine dans une lignée NK humaine (4). Cette molécule adaptatrice contient des motifs YxxM capable de fixer les sous-unités régulatrices des PI3K de classe IA. L'engagement du récepteur activateur CD161c sur les cellules NK de souris, induit l'activation d'un effecteur de la PI3K, la protéine sérine/thréonine kinase Akt. Cette activation de la voie PI3K/Akt n'est pas retrouvée sur les cellules NK isolées à partir de rate de souris déficientes en BCAP. Contrairement à toute attente, l'absence d'expression de BCAP chez ces souris, entraîne une augmentation de cellules NK matures avec une résistance accrue à l'apoptose. Ces observations montrent la complexité de ces études pour évaluer le rôle d'une molécule de signalisation dans un système intégré comme le développement et l'activation

des cellules NK. Une des conclusions de ces travaux sur la protéine BCAP est qu'il faut évaluer l'implication de BCAP dans la transmission du signal aux différents stades de maturation des cellules NK. Le côté frustrant de l'étude reste que les mécanismes de signalisation positifs ou négatifs via l'adaptateur BCAP ne sont pas élucidés. Pour cela, en sus des modèles souris, il faut utiliser des modèles cellulaires pertinents qui permettent de disséquer les mécanismes de signalisation utilisant ces adaptateurs. Ces approches ont été utilisées pour démontrer que des événements de phosphorylation sur résidus tyrosine, souvent considérés comme constituants d'un signal activateur, étaient aussi impliqués dans le signal inhibiteur dans les cellules NK. Ici, nous résumerons brièvement les travaux réalisés sur différents adaptateurs, Crk (CT10 regulator of kinase) et des membres de la famille SAP (signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-associated protein), EAT-2 (Ewing's sarcoma associated transcript-2) et ERT (EAT-2-related transducer) qui permettent la transmission d'un signal négatif lorsqu'ils sont phosphorylés (cf Figure).

Pour mettre en évidence ces phosphorylations, des lignées NK exprimant des récepteurs inhibiteurs définis ont été mis en contact avec des cellules cibles exprimant les ligands HLA correspondant aux récepteurs inhibiteurs à étudier (5). Ces modèles cellulaires ont permis d'identifier des événements uniques de phosphorylation induits par l'engagement de récepteurs inhibiteurs et non pas par des récepteurs activateurs. L'engagement d'un récepteur KIR ou CD94-NKG2A induit une association de la PTK, c-Abl avec l'adaptateur Crk. Crk se retrouve phosphorylé sur un résidu tyrosine en position 221 (Y221), probablement par c-Abl. Des cellules NK exprimant une molécule chimérique permettant de localiser l'adaptateur Crk (muté ou non sur Y221) à la membrane plasmique, ont été générées et des tests de cytotoxicité ont été réalisés. Les résultats montrent que la perte de phosphorylation de Crk permet de restaurer une fonction cytolytique des cellules NK, montrant de façon élégante que cet événement de phosphorylation est impliqué dans le signal inhibiteur.

Les membres de la famille SAP possèdent un domaine d'interaction protéine-protéine, SH2 (Src-homology

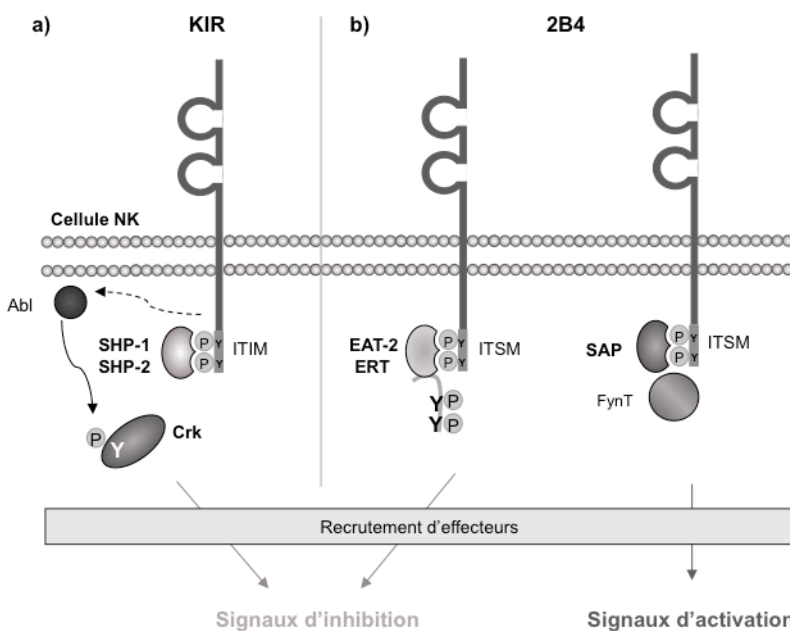


Figure: Des événements des phosphorylations sur résidus tyrosines impliqués dans le signal inhibiteur des cellules NK.

a) L'activation du récepteur KIR se manifeste par le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 au niveau des résidus tyrosine phosphorylés des motifs intracellulaires ITIM (Immuno Tyrosine Inhibitory Motifs). L'engagement de ces récepteurs induisent l'activation de la tyrosine kinase Abl qui phosphorylerait l'adaptateur Crk, permettant aussi l'induction de signaux inhibiteurs (d'après Peterson M.E. & E.A. Long, Immunity 2008).

b) L'activation du récepteur inhibiteur/activateur 2B4 engendre le recrutement de protéines adaptatrices de la famille SAP: SAP, EAT-2 ou ERT. La phosphorylation des tyrosines des motifs ITSM (Immuno Tyrosine Switch Motifs) présents sur la partie intracellulaire du récepteur permettent le recrutement de ces protéines adaptatrices. Le recrutement d'effecteurs permet d'induire des signaux d'activation pour SAP via son interaction avec la protéine tyrosine kinase FynT et des signaux d'inhibition pour EAT-2/ERT par le biais de ses tyrosines phosphorylables (d'après Veillette A., Nature Reviews in Immunology 2006).

2) et sont exclusivement exprimés dans les cellules du système immunitaire dont les cellules NK (pour revue (6)). Le gène codant pour SAP (SH2D1A chez l'homme) se retrouve muté et inactivé dans 50 à 70% des cas de syndrome lympho-prolifératif lié au chromosome X (X-linked lymphoproliferative disease, XLP), caractérisé par des réponses immunes anormales aux infections au virus Epstein-Barr. Ces adaptateurs sont recrutés à la membrane plasmique par des molécules d'adhérence de la famille SLAM qui possèdent dans leur partie intracytoplasmique un motif immunoreceptor tyrosine-based switch motifs (ITSMs : TI/VYxxV/I). Ces motifs peuvent fixer soit des protéines ou lipides phosphatases, soit des adaptateurs de la famille SAP. Récemment, en utilisant des cellules de patients XLP, des souris invalidées pour les différents gènes codant les adaptateurs SAP et des modèles cellulaires appropriés, de nouveaux mécanismes ont pu être proposés montrant que des événements de phosphorylation sur résidu tyrosine sont impliqués dans la transmission d'un signal négatif. Suivant le membre de la famille SAP recruté au niveau du récepteur SLAM (dans le schéma de la figure est représenté le récepteur 2B4, membre de la famille SLAM), le signal transmis sera totalement différent. Si l'adaptateur SAP est recruté, il permet une association avec la PTK de la famille Src, Fyn intervenant dans la transmission du signal positif. Si les adaptateurs EAT-2 ou ERT sont recrutés, ils se retrouvent phosphorylés sur leur région carboxy-terminale et ces résidus tyrosine sont essentiels pour la transmission d'un signal inhibiteur. La nature des effecteurs qui s'associeraient

à ces motifs phosphorylés sur EAT-2 et ERT, demeure inconnue. Ces travaux montrent toute la pertinence d'accumuler différentes approches pour proposer de nouveaux modèles de régulation du signal NK. Dans le cas des molécules de la famille SAP, ces travaux montrent que des variations de taux de molécules adaptatrices disponibles au cours de la vie de la cellule NK vont fortement influencer le devenir de ces cellules.

Adaptateurs et signal NK : quelques pistes.

Les travaux sur les molécules adaptatrices dans l'encodage du signal NK ont permis d'étendre nos connaissances à la fois sur la régulation des voies de signalisation, mais également sur la plasticité des cellules NK. Ces approches nécessitent d'accumuler différents types de modèles cellulaires et surtout animaux pour pouvoir à la fois étudier les mécanismes de transduction et les fonctions de ces molécules dans les cellules NK normales ou en situation pathologique. Beaucoup de molécules adaptatrices citées dans cette brève sont encodées par des gènes qui sont fortement exprimés dans le lignage NK. Une façon simple de trouver de nouveaux adaptateurs impliqués dans le signal NK, sera de revisiter des banques de données qui répertorient des profils d'expression génique des différents lignages hématopoïétiques (par exemple <http://biogps.gnf.org/>) avec des filtres «criblages adaptateurs». Les modèles murins sont des systèmes incontournables actuellement pour étudier ces molécules adaptatrices, il reste qu'un des problèmes rencontrés

dans l'interprétation des résultats est de savoir si l'effet observé dans les cellules NK matures est dû à un effet direct de la manipulation de l'adaptateur ou une conséquence due à un quelconque défaut lors du développement de la cellule NK. Pour cela, il faudra imaginer de pouvoir manipuler sélectivement un gène dans le compartiment NK (7) et de pouvoir réguler son expression au cours du développement. Par la suite, ces gènes pourraient être sélectivement étiquetés pour permettre d'envisager une analyse des complexes protéiques associés aux adaptateurs aux différents stades de maturation ou d'activation des cellules NK. Des approches de ce type (avec une molécule adaptatrice étiquetée) en utilisant des souris transgéniques, ont montré leur pertinence pour aborder de nouvelles relations entre récepteurs activateurs NK et récepteurs aux cytokines (8). Pour pouvoir analyser ces données à l'échelon unicellulaire et/ou moléculaire, il faudra utiliser des technologies qui nécessiteront peu de matériel, comme des analyses des événements de signalisation par cytométrie (9) et des «nano-techniques» en protéomique.

Ces travaux sur les molécules adaptatrices dans le signal NK permettront sans nul doute d'élargir nos connaissances en immunologie et peut-être de découvrir de nouveaux mécanismes de régulation plus généraux au monde du vivant.

REFERENCES

1. Lanier, LL 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9:495-502.
2. Vivier, E et al 2004. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306:1517-1519.
3. Zompi, S., et al 2003. NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat Immunol* 4:565-572.
4. MacFarlane, A et al 2008. Enhanced NK-cell development and function in BCAP-deficient mice. *Blood* 112:131-140.
5. Peterson, ME & Long EO 2008. Inhibitory receptor signaling via tyrosine phosphorylation of the adaptor Crk. *Immunity* 29:578-588.
6. Veillette, A et al 2009. Importance and mechanism of 'switch' function of SAP family adapters. *Immunol Rev* 232:229-239.
7. Walzer, T et al 2007. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3384-3389.
8. Horng, T et al 2007. NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat Immunol* 8:1345-1352.
9. Firaguay, G & Nunès JA 2009. Analysis of signaling events by dynamic phosphoflow cytometry. *Sci Signal* 2:pl3.