

Évaluation d'un test basé sur la cytométrie de flux pour l'activité des lymphocytes Natural Killer en milieu clinique

R. Valiathan*†, J. E. Lewis*‡, A. B. Melillo*‡, S. Leonard*‡, K. H. Ali§ et D. Asthana*†

Résumé

Les lymphocytes Natural killer (cellules tueuses naturelles, NK) jouent un rôle important non seulement dans la défense de première ligne contre les infections virales et bactériennes, mais aussi dans la surveillance immunitaire des cellules malignes ; la cytotoxicité des lymphocytes NK est donc un indicateur primaire de la fonction immunitaire. Bien que le test de libération du chrome soit reconnu comme « l'étalon-or » pour mesurer l'activité des lymphocytes NK, il présente des inconvénients tels que l'utilisation de composés radioactifs, une faible charge et une forte libération spontanée. Il est difficile d'effectuer ce dosage en laboratoire clinique en raison des difficultés liées à l'élimination des déchets radioactifs et des problèmes de normalisation. Nous décrivons une méthode de dosage basée sur la cytométrie de flux visant à mesurer l'activité des lymphocytes NK en incorporant un colorant fluorescent, le DiO, dans les membranes des cellules cibles. L'activité des lymphocytes NK a été mesurée au départ, puis après 1 et 4 semaines de suivi chez 20 personnes en bonne santé qui prenaient un complément alimentaire immunomodulateur destiné à améliorer la fonction des lymphocytes NK. Le pourcentage moyen d'activité des lymphocytes NK à la référence (21,5 ; ET = 9,3) a augmenté de manière significative pour atteindre un niveau maximal à une semaine (31,3 % ; ET = 7,9 ; $p = 0,007$), puis est revenu au niveau de référence à 4 semaines (21,5 ; ET = 8,3). Une caractéristique importante des tests basés sur la cytométrie de flux est leur capacité à distinguer les cellules effectrices des cellules cibles et leur potentiel à expliquer les interactions moléculaires qui sous-tendent la lyse des cellules cibles. Dans un contexte clinique, ce test sera intéressant pour surveiller fréquemment le statut immunologique des patients sous traitement pour diverses pathologies qui affectent leur statut immunitaire. Le test est facile à réaliser sans utiliser de matériel radioactif et pourrait donc devenir un outil de suivi de la pathogenèse et de la reconstitution immunitaire.

*Department of Psychiatry et Behavioral Sciences, Miami, FL, USA ; Laboratory for Clinical and Biological Studies, Miami, FL, USA ; †Center for Complementary and Integrative Medicine, Miami, FL, USA ; et ‡Pharmacognosia Inc, Rainier, WA, USA.

Reçu le 18 juillet 2011 ; Accepté sous forme révisée le 4 novembre 2011

Correspondance adressée à : D. Asthana PhD, MBA, Associate Professor, Department of Psychiatry et Behavioral Sciences, University of Miami Miller School of Medicine, Laboratory for Clinical and Biological Studies, 1550 NW 10th Avenue, Room # 118, Fox Building, Miami, FL 33136, USA. 33136, USA. Courriel : dasthan@med.miami.edu

Introduction

La cytotoxicité à médiation cellulaire est un mécanisme utilisé par les cellules immunitaires pour se défendre contre les pathogènes intracellulaires, les cellules tumorales et les greffes de tissus allogéniques [1-3]. Les cellules tueuses naturelles (NK) sont généralement considérées comme des éléments de la défense immunitaire innée, car elles sont dépourvues de récepteurs de surface spécifiques à l'antigène [2, 4]. Les lymphocytes NK effectuent une cytolyse dépendante du contact cellulaire des cellules cibles, notamment celles qui expriment des molécules étrangères du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il a été démontré que les lymphocytes NK participent au contrôle précoce d'une l'infection virale [1] et à l'immunosurveillance [5] chez l'humain et chez la souris. Contrairement aux lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes NK sont capables d'induire la mort directe des cellules tumorales et des cellules infectées par un virus en l'absence d'immunisation spécifique. En outre, dans de nombreuses états physiologiques et pathologiques, les lymphocytes NK ont été identifiées comme des producteurs majeurs de cytokines, telles que l'interféron- γ (IFN- γ), le

facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et l'interleukine IL-10 [3, 6]. La destruction des cellules cibles par les lymphocytes NK renforce la réponse des lymphocytes T, soit en diminuant la charge antigénique [7], soit en aidant à la présentation de l'antigène aux lymphocytes T cytotoxiques grâce aux débris créés par l'élimination des cellules NK [8]. Même si la plupart des lymphocytes NK présentes dans l'organisme sont au repos, une fois activées, leurs actions cytotoxiques deviennent vigoureuses.

Un indicateur important et fréquemment mesuré de la fonction immunitaire est la cytotoxicité des lymphocytes NK, qui serait plus faible dans certains états de santé, comme l'immunodéficience primaire, les infections par le VIH à un stade avancé et les femmes enceintes [4, 9-11]. La cytotoxicité des lymphocytes NK est très variable chez les individus apparemment en bonne santé et peut être classée en niveau élevé ou faible [12]. Récemment, l'analyse du nombre et de la fonction des lymphocytes NK est devenue une pratique plus courante dans certaines maladies. En outre, un faible niveau d'activité des lymphocytes NK peut être utile pour prédire l'issue de la maladie [10, 13].

Le test « étalon-or » pour l'activité des lymphocytes NK est le test de libération de chrome. Depuis 1968, la méthode de libération du chrome radioactif (^{51}Cr) est utilisée pour déterminer l'activité cytolytique des populations de cellules effectrices. Le test de libération du chrome présente de nombreuses limites, notamment : (1) radioactivité dangereuse ; (2) coût élevé ; (3) courte demi-vie ; (4) exigences accrues en matière de personnel pour la formation à la radioprotection et l'octroi des autorisations ; et (5) élimination des déchets. La méthode au ^{51}Cr ne peut être utilisée que pour un nombre limité de cibles qui se marquent immédiatement avec des quantités adéquates pour la détection définitive de la lyse (c'est-à-dire que le test ne peut être interprété avec une libération spontanée élevée de Cr). La variabilité inter-laboratoire de ce test est également préoccupante, d'autant plus que des programmes de tests de compétence ne sont pas systématiquement mis en place. La dernière limite de test est que la mort n'est pas mesurée au niveau d'une seule cellule. Pour toutes ces raisons, le processus de développement et de validation de nouveaux tests susceptibles de remplacer la libération de Cr est en cours, et plusieurs méthodes alternatives ont été introduites [14-17].

L'objectif de la présente étude était de normaliser et d'évaluer un test basé sur la cytométrie de flux dans les laboratoires cliniques de routine pour mesurer l'activité des lymphocytes NK. Les tests par cytométrie en flux évitent les problèmes liés à l'utilisation de la radioactivité et sont rapides et plus pratiques pour la standardisation.

Nous décrivons comment la cytométrie de flux peut être utilisée pour déterminer l'activité des lymphocytes NK au fil du temps dans un groupe d'individus participant à un essai clinique. Ce test utilise deux colorants fluorescents pour distinguer les cellules effectrices des cellules cibles et les cellules cibles vivantes des cellules mortes. Le premier colorant, le perchlorate de 3,3'- diocadécylloxycarbocyanine (DiO) [18], est un colorant fluorescent vert qui a été utilisé pour marquer les membranes plasmiques de K562, une lignée de cellules tumorales érythroleucémiques humaines utilisée comme population cible. Le second colorant, l'iodure de propidium (IP), un colorant fluorescent rouge imperméable aux membranes, a été ajouté au cours du test, lorsque les membranes des cellules cibles ont été perturbées par des lymphocytes de type NK (l'IP s'est lié à l'ADN des cellules dont la membrane était compromise). Bien entendu, les goudrons compromis dans la membrane et les effecteurs ont été marqués par IP et ont présenté une fluorescence rouge ; cependant, seules les cibles prémarquées par DiO ont présenté une fluorescence verte et ont été capables de différencier les cellules effectrices et les cellules cibles. Les cellules cibles intactes non affectées par les effecteurs étaient simples positives (et présentaient uniquement une fluorescence verte), tandis que les cibles tuées par des effecteurs portant des membranes perturbées étaient doubles positives (et présentaient une fluorescence verte ainsi qu'une fluorescence rouge). Nos résultats indiquent que ce test modifié basé sur la cytométrie de flux est hautement reproductible et qu'il permet de différencier les personnes présentant une activité faible ou élevée des lymphocytes NK au départ et également après la prise d'un complément alimentaire immunomodulateur connu pour renforcer l'activité des lymphocytes NK. Ce test prend moins de temps et est facilement adaptable dans un laboratoire clinique.

Matériels et méthodes

Sujets et échantillons. Des adultes sains ($n = 20$) ont été recrutés par référence à University of Miami Miller School of Medicine en 2010, après approbation de l'étude par le comité d'examen institutionnel. Les sujets ont reçu un complément alimentaire renforçant le système immunitaire pendant 30 jours. Le complément alimentaire utilisé était le Rice Bran Arabinoxylan Compound (RBAC), un complément nutritionnel qui s'est avéré avoir un effet modificateur de la réponse biologique sur la fonction du système immunitaire dans des études sur des souris et chez l'humain [19, 20]. Du sang veineux a été prélevé à trois moments différents (référence, 1 semaine et 4 semaines) chez tous les participants et les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont été isolées par centrifugation en gradient Ficoll-Hypaque et cryoconservées à $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Réactifs. Les cellules K562 de leucémie myélogène chronique humaine (ATCC #CCL-243) ont été utilisées pour le test NK. Le perchlorate de 3,3'-diocadécylloxycarbocyanine (DiO) (Invitrogen, San Diego, CA, USA) a été dissous dans du sulfoxyde de diméthyle (Sigma, St. Louis, MO, USA) à une concentration de 3 mM. Des aliquotes ont été congelées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et décongelées pour chaque expérience. Les milieux du Roswell Park Memorial Institute (RPMI) avec et sans rouge de phénol ont été obtenus auprès de Gibco (Invitrogen). Le milieu complet (MC) était constitué de milieu RPMI complété par 1076 de sérum bovin fœtal, 100-U de pénicilline, 100-mg/ml de streptomycine et 50-mg/ml de gentamicine. L'iodure de propidium (IP) (Sigma) a été dissous dans du MC pour obtenir une solution de travail de 10 mg/100ml. Le sérum bovin fœtal a été obtenu auprès de Cellgro (Manassas, USA).

Le dénombrement des sous-ensembles de lymphocytes NK par cytométrie de flux a été effectué à l'aide d'anticorps contre CD45, CD3 et CD16⁺ CD56⁺. Tous les anticorps ont été achetés à BD Biosciences, CA. L'analyse de l'activité des lymphocytes NK par cytométrie de flux a été modifiée à partir de méthodes précédemment publiées pour mesurer l'activité des lymphocytes NK [18, 21].

Préparation des cellules cibles. Des cultures en phase logarithmique de cellules de leucémie myélogène chronique humaine K562 (ATCC #CCL-243) ont été remises en suspension à une concentration de 10^6 cellules/ml dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBSA) et marquées en ajoutant 2 μl de 3 mM de chlorate de diocadécylloxycarbocyanine (DiO) à 1 ml de cellules K562, incubées à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un incubateur 576 CO₂ pendant 20 minutes, puis lavées et remises en suspension à une concentration finale de 10^6 cellules/ml dans un milieu RPMI-1640 avec 1076 sérum de veau fœtal (R-10) sans rouge de phénol.

Préparation des cellules effectrices. Les PBMC ont été testés en même temps afin d'éviter toute variation entre les tests. Les PBMC décongelés et au repos pendant une nuit ont été lavés et remis en suspension à une concentration finale de 10^6 cellules/ml dans un milieu R-10 sans rouge de phénol.

Test d'activité des lymphocytes NK. Des cellules effectrices et des cellules cibles ont été ajoutées dans des tubes pour créer quatre rapports effecteur/cible (E:C) différents : 25:1, 12,5:1, 6,25:1 et 3,125:1.

Une solution de 0,15 mM d'IP (130 µl) a été ajoutée aux tubes et centrifugée pendant 30 s à 1000 g pour culotter les cellules et a été incubée pendant 2 h à 37 °C dans un incubateur à 5 % de CO₂ et analysée par le cytomètre de flux FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, États-Unis). Au total, 20 000 événements ont été enregistrés. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel CELLQUEST pro (v5.2) (BD Biosciences). Les contrôles étaient constitués de cellules cibles uniquement et de PI et de cellules effectrices uniquement et de PI et ont été utilisés pour détecter la lyse spontanée et les cellules effectrices non viables, respectivement.

Calcul du pourcentage de lyse, des unités lytiques et de l'activité lytique. Le pourcentage de lyse a été calculé comme suit : [Cellules positives pour la DiO et l'IP/total des cellules marquées à la DiO] * 100 – lyse spontanée.

Unités lytiques. L'unité lytique a été définie comme le nombre de cellules effectrices nécessaires pour lyser un pourcentage donné de cellules cibles [22]. Le niveau de lyse de référence a été considéré comme étant de 15 %. Unités lytiques = rapport E:C entraînant une lyse de 15 % * nombre de cibles.

Activité lytique. L'activité lytique a été définie comme le nombre d'unités lytiques contenues dans 10⁷ cellules effectrices (Nombre d'unités lytiques/10⁷ effecteurs = 10⁷/T * X_p(T, nombre de cellules cibles ; p, niveau de lyse de référence (15%) ; X_p, rapport E:C nécessaire pour lyser % des cibles)). Les unités lytiques ont été calculées comme le nombre de cellules effectrices nécessaires pour lyser 15% de 2 x 10⁴ cellules cibles, les résultats étant exprimés en nombre d'unités lytiques contenues dans 1 x 10⁶ PBMC. Le pourcentage de lyse spécifique a été calculé pour 15 %

de cellules cibles pour chaque rapport E:C. Le pourcentage de lyse spécifique a ensuite été utilisé pour calculer les unités lytiques.

Analyse statistique. L'activité des lymphocytes NK a été évaluée à l'aide de tests *t* pour échantillons appariés entre la référence, 1 semaine et 4 semaines.

Résultats

Fréquence et nombre absolu de NK

La fréquence et le nombre absolu de lymphocytes NK n'ont pas changé après la prise d'un complément alimentaire immunomodulateur. Un diagramme de points représentatif montrant la coloration par cytométrie de flux des sous-ensembles de lymphocytes NK du sang périphérique est illustré à la figure 1A. Les lymphocytes ont été classés en tant que cellules CD45⁺, et les lymphocytes NK ont été identifiés en tant que cellules CD45⁺ CD3-CD16⁺ CD56⁺. Les fréquences (Fig. 1B) et les nombres absolus (Fig. 1C) de lymphocytes NK n'ont pas changé après la prise de modulateurs immunitaires chez des adultes sains (Fig. 1), quel que soit le moment testé.

Pourcentage d'activité spécifique des lymphocytes NK

Le pourcentage d'activité spécifique des lymphocytes NK à différents rapports E:T au départ, 1 semaine et 4 semaines après la prise du complément alimentaire immunomodulateur était constant pour chaque point dans le temps. Comme le montrent les Figures 2A et B, l'activité des lymphocytes NK était clairement évidente avec différents rapports E:C à différents moments.

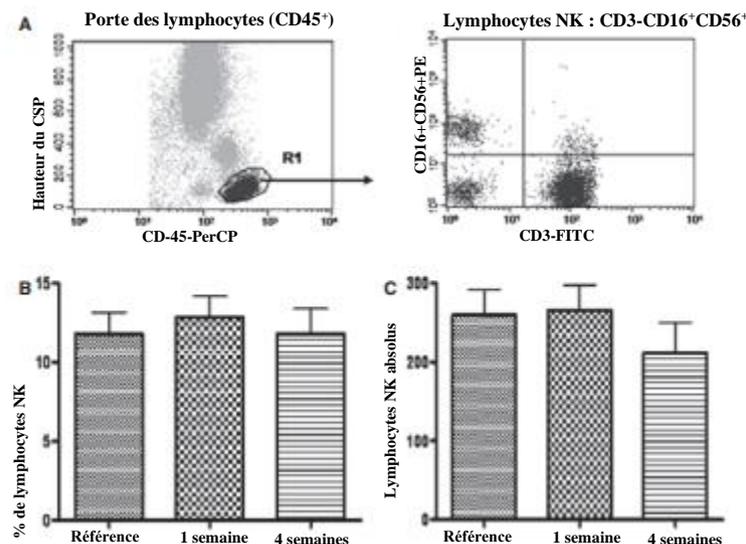


Figure 1 Fréquence et nombre absolu de lymphocytes NK pendant la prise de compléments alimentaires : La fréquence et le nombre absolu de lymphocytes NK n'ont pas changé après la prise de compléments alimentaires chez des adultes sains. Le sang total (100 µl) a été coloré avec des anticorps anti CD45, CD3 et CD16⁺ 56 pendant 30 minutes à température ambiante. Après lyse des GR, les cellules ont été lavées, fixées et analysées par cytométrie de flux. (A) Les lymphocytes ont été classés en tant que cellules CD45⁺ et les cellules NK ont été identifiées en tant que cellules CD45⁺ CD3-CD16⁺ CD56⁺. Diagramme à barres montrant (B) les fréquences moyennes et (C) les nombres absolus moyens de lymphocytes NK à la référence et 1 semaine et 4 semaines après la prise du complément alimentaire. Chaque barre représente la valeur moyenne et les barres d'erreur sont basées sur l'erreur standard de la valeur moyenne de chaque point temporel.

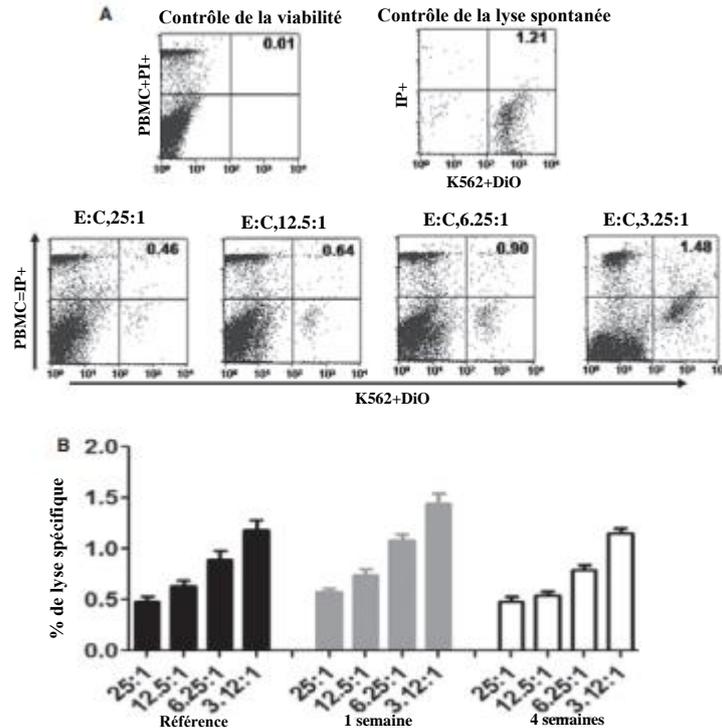


Figure 2 Test d'activité des lymphocytes NK basé sur la cytométrie de flux : Des cellules effectrices (PBMC) et 10 000 cellules cibles (cellules K562 marquées à la DiO) ont été ajoutées à des tubes pour créer quatre rapports effecteur-cible (E:C) différents : 25:1, 12,5:1, 6,25:1 et 3,125:1. Une solution de 130 μ l (0,15 mM) d'iodure de propidium (IP) a été ajoutée aux tubes et incubée pendant 2 h à 37 °C dans 5 % de CO₂ et analysée par cytométrie de flux. Au total, 20 000 événements ont été enregistrés. Les contrôles étaient constitués de cellules cibles uniquement et d'IP et de cellules effectrices uniquement et de PI et ont été utilisés pour détecter la lyse spontanée et les cellules effectrices non viables, respectivement. (A) Diagrammes de points représentatifs montrant les rapports E:T à 25:1, 12,5:1, 6,25:1 et 3,125:1 ainsi que le contrôle de viabilité qui ne contenait que des PBMC avec IP et le contrôle de lyse spontanée qui ne contenait que des K562 avec DiO et IP. (B) Chaque barre représente la moyenne du pourcentage de lyse spécifique à 25:1, 12,5:1, 6,25:1, 3,125:1 pour la référence, 1 semaine et 4 semaines et les barres d'erreur sont basées sur l'erreur standard de la valeur moyenne de chaque point temporel.

L'activité maximale des lymphocytes NK a été observée à 1 semaine par rapport aux autres points dans le temps.

Activité des lymphocytes Naturel Killer

Les modifications de l'activité des lymphocytes NK après la prise d'un complément alimentaire immunomodulateur ont été détectés par le test basé sur le flux. Des diagrammes de points représentatifs montrant la détermination par cytométrie de flux de l'activité des lymphocytes NK d'un participant sont illustrés à la Figure 3A. Les modifications d'activité des lymphocytes NK entre le début et la quatrième semaine étaient mesurables par ce test. Pendant la prise du complément alimentaire immunomodulateur, le pourcentage moyen de base de l'activité des lymphocytes NK était de $21,5 \pm 9,3$, qui a augmenté de manière significative après 1 semaine ($31,3 \pm 7,9$, $P = 0,007$) et a ensuite diminué jusqu'à son niveau de référence après 4 semaines ($21,5 \pm 8,3$; Fig. 3B).

Pourcentage de lyse spécifique et détermination des unités lytiques

Les unités lytiques ont été calculées comme deuxième indice de l'activité des lymphocytes NK. Nous avons calculé les unités lytiques par PBMC et les unités lytiques obtenues ont également montré un schéma similaire à l'activité des lymphocytes NK. Le pourcentage de lyse spécifique pour 15 % des cellules cibles était plus élevé après une semaine (Fig. 3C), ce qui indique une nette différence dans le pourcentage de lyse spécifique après la prise du complément alimentaire. Les unités lytiques obtenues à la référence, 1 semaine et 4 semaines après la prise d'immunomodulateurs pour chaque participant à l'étude sont indiquées dans le Tableau 1. Les unités lytiques moyennes après une semaine étaient de $168,2 \pm 68,9$, ce qui était significativement plus élevé que les niveaux de référence ($115,7 \pm 56,8$; $P = 0,017$). Les unités lytiques ont diminué jusqu'à des niveaux proches de la référence à 4 semaines ($95,5 \pm 44,4$; $P = 0,008$) (Fig. 3D). Aucun changement significatif n'a été observé dans le nombre absolu de lymphocytes NK.

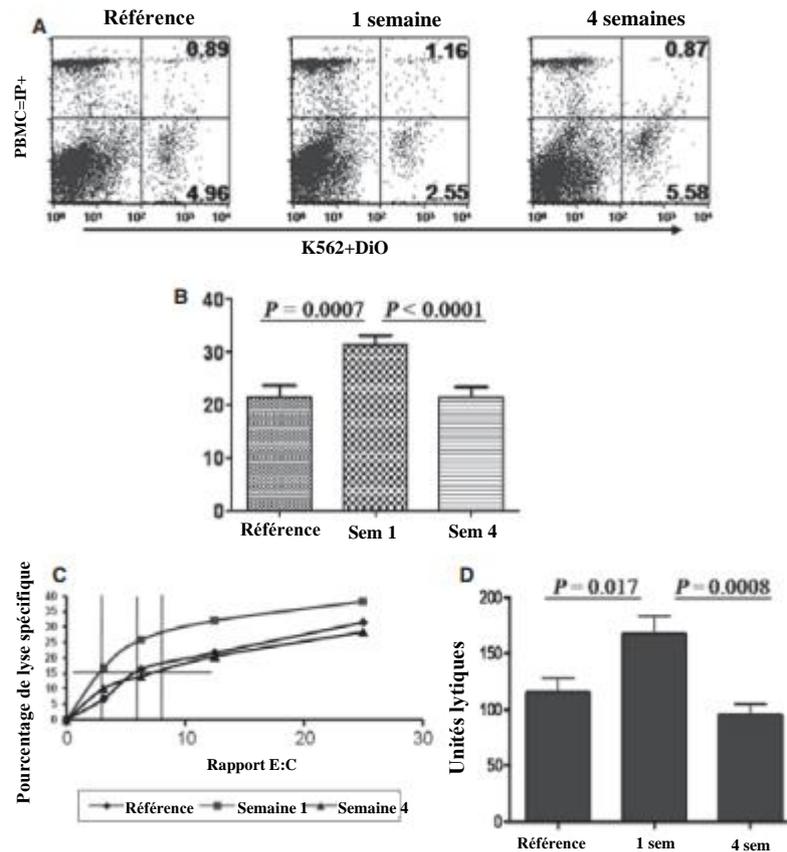


Figure 3 Pourcentage d'activité des lymphocytes NK et unités lytiques après une semaine de prise de complément alimentaire : (A) Diagrammes de points représentatifs montrant l'activité des lymphocytes NK basée sur la cytométrie de flux à la référence, à 1 semaine et à 4 semaines chez un participant à l'étude. (B) Pourcentage d'activité des lymphocytes NK enregistré pour les échantillons aux points de référence, 1 semaine et 4 semaines et (C) Graphique linéaire montrant le pourcentage de lyse spécifique pour 15% cellules cibles à différents rapports E:C pour les points à la référence, 1 semaine et 4 semaines d'un participant à l'étude. (D) Diagramme à barres montrant les unités lytiques calculées sur la base du pourcentage de lyse spécifique pour 15% cellules cibles pour les échantillons au départ, à 1 semaine et à 4 semaines. Chaque barre représente la valeur moyenne et les barres d'erreur sont basées sur l'erreur standard de la valeur moyenne de chaque point temporel.

Discussion

Les lymphocytes Natural Killer sont des composants importants du système immunitaire inné en raison de leur production de cytokines et de leur activité cytolytique contre les cellules cibles. Les lymphocytes NK semblent jouer un rôle crucial dans la défense immunologique innée et la régulation de la réponse immunitaire sans restriction de CMH [3-5]. En clinique, l'activité des lymphocytes NK *in vitro* est un indicateur important des corrélations possibles entre l'activité des lymphocytes NK et l'issue ou la progression de la maladie [2, 3, 5, 23, 24]. L'essai de référence pour l'activité des lymphocytes NK est l'essai de libération de ^{51}Cr . Dans ce test, le chrome radioactif internalisé libéré par les cellules cibles lors de la cytolysse par les lymphocytes NK a été quantifié en mesurant la quantité de radioactivité libérée à l'aide d'un compteur gamma [10, 18, 25, 26]. Cependant, d'innombrables difficultés liées à ce test l'empêchent d'être utilisé de manière routinière en milieu clinique. Il est difficile à standardiser, coûteux, prend du temps, utilise des réactifs à courte demi-vie et nécessite l'élimination des déchets

de matières radioactives et dangereuses. Par conséquent, le développement d'une méthode alternative pour mesurer l'activité des lymphocytes NK serait souhaitable en milieu clinique. Dans un contexte clinique, un test d'activité des lymphocytes NK basé sur la cytométrie de flux serait intéressant pour surveiller fréquemment l'état immunologique des patients sous traitement pour différentes maladies [21]. Les avantages de cette approche comprennent : (1) pas d'utilisation de matériaux radioactifs ; (2) facilité d'utilisation d'un grand nombre d'échantillons ; et (3) possibilité de réaliser plusieurs points temporels ensemble pour réduire la variabilité intra- et inter-tests [18, 21, 25, 26]. Dans la présente étude, l'activité des lymphocytes NK basée sur la cytométrie de flux était hautement reproductible, et ces données de flux ont pu être utilisées pour calculer les unités lytiques, qui sont conventionnellement utilisées pour exprimer la cytotoxicité des lymphocytes NK.

Dans cette étude, nous avons sélectionné un groupe de 20 personnes saines qui prenaient un complément alimentaire connu pour renforcer l'activité des lymphocytes NK. Nous avons évalué l'activité des cellules NK sur trois points temporels par une approche modifiée basée sur la cytométrie de flux décrite précédemment [18, 21]. Notre

Tableau 1 Unités lytiques à la référence, à 1 semaine et à 4 semaines lors la prise d'un complément alimentaire.

Sujet	Référence LU	1 semaine LU	4 semaines LU
1	161	250	80
2	108	161	124
3	156	238	111
4	99	357	64
5	172	100	63
6	113	52	113
7	83	138	100
8	42	93	93
9	89	192	71
10	20	156	85
11	208	64	52
12	42	208	16
13	54	179	63
14	50	102	46
15	208	147	156
16	156	185	192
17	119	200	104
18	100	156	119
19	172	185	111
20	161	200	147
Moyenne ± ET	115,66 ± 56,79	168,17 ± 69,89*	95,486 ± 41,44

*Les unités lytiques moyennes à une semaine étaient significativement plus élevées que celles de la référence ($P = 0,017$).

était de normaliser le test et d'explorer la faisabilité de ce test dans notre laboratoire clinique. Nous avons sélectionné des sujets sains et normaux pour les raisons suivantes. Tout d'abord, comme ces personnes étaient en bonne santé, les résultats des données reflètent l'effet réel du complément alimentaire sur les lymphocytes NK, et les changements détectés dans les données peuvent être comparés entre l'amélioration pré- et post-immunitaire. Deuxièmement, les variations mineures dans les données sont le reflet de l'amélioration immunitaire due au complément alimentaire dans un groupe de sujets dont le système immunitaire est au repos. Nous n'avons pas comparé nos données avec la libération classique de ^{51}Cr , car nous avons évalué les résultats avant et après la prise du complément alimentaire. Ainsi, les résultats des données basées sur le flux effectué simultanément ont reflété les changements réels de l'activité des lymphocytes NK en raison de l'effet du complément alimentaire. Contrairement à d'autres études utilisant une approche basée sur le flux, notre échantillon de sujets nous a permis de valider les résultats du test en analysant simultanément l'activité des lymphocytes NK chez les mêmes personnes avant et après l'immunomodulation.

De nombreux rapports ont documenté les méthodes basées sur la cytométrie de flux pour mesurer l'activité des lymphocytes NK [10, 18, 26, 27]. La méthode décrite ici utilise l'incorporation d'un colorant fluorescent lipophile vert, le DiO, dans les membranes des cellules cibles cultivées. Ce colorant permet de distinguer facilement les cellules cibles des cellules effectrices par cytométrie de flux. En outre, l'incorporation d'IP permet d'identifier les cellules mortes grâce à l'intercalation de l'IP dans l'ADN nucléaire [18]. L'IP est fluorescent dans le spectre orange-rouge,

le pourcentage de cellules cibles endommagées par les lymphocytes NK effecteurs a pu être déterminé avec précision par une analyse en double fluorescence.

Cette méthode utilise des éléments de travaux déjà publiés sur les flux [18, 21], mais nous avons testé cette approche dans un laboratoire clinique avec des échantillons de sujets chez lesquels l'amélioration de l'activité des lymphocytes NK était attendue puisqu'il s'agissait d'humains normaux et sains ne présentant aucune pathologie clinique affectant le système immunitaire. Nous avons inclus les cellules cibles et les cellules effectrices dans l'analyse de l'activité des lymphocytes NK plutôt que d'utiliser uniquement les cellules cibles. Cette approche permet de prendre en compte les changements dans les propriétés de diffusion de populations effectrices et cibles moins distinctes, au fur et à mesure que les cellules sont endommagées. Dans notre analyse, nous avons défini les cellules cibles comme étant celles qui conservent une coloration brillante de la DiO (double fluorescence). Nous avons estimé que les lymphocytes NK pouvaient également présenter une intégrité membranaire affaiblie après incubation avec l'IP et que le pourcentage de lyse des cibles pouvait être surestimé si les cellules colorées avec l'IP mais pas avec la DiO étaient incluses. De même, la population cible totale a été utilisée comme dénominateur pour déterminer le pourcentage de lyse par les lymphocytes NK. Le choix de la DiO présente un avantage en termes de spectres d'émission, car la DiO marque les cellules rapidement et efficacement et ne fuit pas de manière appréciable pendant la durée du test de cytométrie de flux [10, 25].

Nous avons également utilisé avec succès les données dérivées de ce test pour le calcul des unités lytiques. L'unité lytique est principalement utilisée pour exprimer les niveaux d'activité des lymphocytes NK. Les unités lytiques peuvent être considérées comme un deuxième indice de l'activité cytotoxique [22]. Les unités lytiques ont été calculées comme le nombre de cellules effectrices nécessaires pour lyser 15 % de $2 \cdot 10^4$ cellules cibles, exprimé comme le nombre d'unités lytiques contenues dans $1 \cdot 10^6$ PBMC. Outre l'utilisation des données brutes de cytotoxicité, l'unité lytique a été la méthode la plus courante de présentation des données dans les études immunitaires sur les tumeurs humaines et animales impliquant des lymphocytes NK, des lymphocytes tueurs activés par lymphokine et des lymphocytes T cytotoxiques [22, 28]. Nous avons observé que nos données sur les unités lytiques étaient comparables à celles de l'activité des lymphocytes NK, ce qui indique que les modifications observées par ce test reflètent des modifications réelles.

Dans le contexte clinique, il serait utile de rapporter l'activité des lymphocytes NK en unités lytiques, car les cliniciens pourraient analyser les données sous différents angles afin de maximiser leur utilité avec un minimum de variabilité. Les résultats du test calculés en pourcentage de lyse spécifique aux quatre différents rapports E:C peuvent être convertis en unités lytiques, comme c'est généralement le cas pour le test de libération de ^{51}Cr . Il est également possible de présenter les données de cytotoxicité par cellule effectrice, en utilisant les valeurs absolues du nombre de cellules déterminées dans l'essai (LU/nombres absolus de lymphocytes NK ou PBMC). Cela permet de distinguer les personnes présentant peu de lymphocytes NK, mais une forte activité des lymphocytes NK, de celles présentant beaucoup de lymphocytes NK, mais une faible activité des lymphocytes NK. En outre, comme pour le test de libération du ^{51}Cr , le

test basé sur le flux peut être utilisé en clinique, car il permet de distinguer les patients présentant une immunodéficience sous-jacente chez lesquels l'activité des lymphocytes NK peut être réduite [21]. Nos données ont également montré que le test est suffisamment sensible pour mesurer les variations biologiques, comme l'indiquent les modifications observées de l'activité des lymphocytes NK des participants individuels évalués en série au fil du temps et/ou à la suite d'une immunomodulation.

La découverte récente de récepteurs inhibiteurs et activateurs sur les lymphocytes NK a suscité un intérêt croissant pour la biologie et l'activité des lymphocytes NK dans des contextes pathologiques [29–31]. Les lymphocytes NK sont programmés pour interagir avec les cellules tissulaires ou hématopoïétiques et jouent un rôle majeur dans la régulation de l'immunité innée [5, 32]. L'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des sous-ensembles de lymphocytes NK a recentré l'attention sur leur activité lytique et sur les interactions moléculaires entre les effecteurs et les lymphocytes NK. Les nouveaux tests multiparamétriques basés sur la cytométrie de flux permettent de mesurer simultanément le phénotype NK et l'activité des lymphocytes NK de différents sous-ensembles de NK. L'essai décrit ici pourrait être adapté pour inclure la mesure simultanée d'autres marqueurs phénotypiques et fonctionnels des cellules NK ainsi que l'activité des cellules NK par le biais d'une approche multiparamétrique. Un autre avantage est que le test n'est pas radioactif. Le test basé sur la cytométrie de flux utilisé dans cette étude peut être utilisé de manière reproductible comme test de routine de l'activité des lymphocytes NK dans les laboratoires cliniques en remplacement du test de libération du ⁵¹Cr. Il pourrait également fournir des données sur l'activité des lymphocytes NK par rapport au nombre absolu de lymphocytes NK ou de PBMC présents dans l'échantillon.

Remerciements

Nous remercions les volontaires qui ont participé à cette étude. Cette étude a été soutenue par les fonds de recherche et de formation du Laboratoire d'études cliniques et biologiques et de Daiwa Pharmaceutical Corporation de Tokyo, Japon.

Références

- 1 Lee SH, Miyagi T, Biron CA. Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol* 2007;28:252–9.
- 2 Moretta L, Ciccone E, Poggi A, Mingari MC, Moretta A. Origin and functions of human natural killer cells. *Int J Clin Lab Res* 1994;24:181–6.
- 3 Vivier E, Raulet DH, Moretta A *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331:44–9.
- 4 Whiteside TL, Herberman RB. Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;1:125–33.
- 5 Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:850–61.
- 6 Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S *et al.* Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004;5:1260–5.
- 7 Robbins SH, Bessou G, Cornillon A *et al.* Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog* 2007;24:3.

- 8 Krebs P, Barnes MJ, Lampe K *et al.* NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood* 2009;113:6593–602.
- 9 Hansen KA, Opsahl MS, Nieman LK, Baker JR Jr, Klein TA. Natural killer cell activity from pregnant subjects is modulated by RU 486. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:87–90.
- 10 Hatam L, Schuval S, Bonagura VR. Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay. *Cytometry* 1994;16:59–68.
- 11 Rook AH, Masur H, Lane HC *et al.* Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Invest* 1983;72:398–403.
- 12 Pross HF, Baines MG. Studies of human natural killer cells. I. *In vivo* parameters affecting normal cytotoxic function. *Int J Cancer* 1982;29:383–90.
- 13 Wiltschke C, Tyl E, Speiser P *et al.* Increased natural killer cell activity correlates with low or negative expression of the HER-2/neu oncogene in patients with breast cancer. *Cancer* 1994;73:135–9.
- 14 Chahroudi A, Silvestri G, Feinberg MB. Measuring T cell-mediated cytotoxicity using fluorogenic caspase substrates. *Methods* 2003;31:120–6.
- 15 Jedema I, van der Werff NM, Barge RM, Willemze R, Falkenburg JH. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood* 2004;103:2677–82.
- 16 Roden MM, Lee KH, Panelli MC, Marincola FM. A novel cytotoxicity assay using fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology. *J Immunol Methods* 1999;226:29–41.
- 17 von Zons P, Crowley-Nowick P, Friberg D, Bell M, Koldovsky U, Whiteside TL. Comparison of europium and chromium release assays: cytotoxicity in healthy individuals and patients with cervical carcinoma. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:202–7.
- 18 Kane KL, Ashton FA, Schmitz JL, Folds JD. Determination of natural killer cell function by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:295–300.
- 19 Ghoneum M, Abedi S. Enhancement of natural killer cell activity of aged mice by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran). *J Pharm Pharmacol* 2004;56:1581–8.
- 20 Ghoneum M, Jewett A. Production of tumor necrosis factor- α and interferon- γ from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinoxylan from rice bran, and its synergy with interleukin-2 *in vitro*. *Cancer Detect Prev* 2000;24:314–24.
- 21 Kim GG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Gooding W, Whiteside TL. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells: comparisons to a 4 h ⁵¹Cr-release assay. *J Immunol Methods* 2007;325:51–66.
- 22 Bryant J, Day R, Whiteside TL, Herberman RB. Calculation of lytic units for the expression of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1992;146:91–103.
- 23 Hidaka Y, Amino N, Iwatani Y *et al.* Increase in peripheral natural killer cell activity in patients with autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity* 1992;11:239–46.
- 24 Levy SM, Herberman RB, Simons A *et al.* Persistently low natural killer cell activity in normal adults: immunological, hormonal and mood correlates. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1989;8:173–86.
- 25 Chang L, Gusewitch GA, Chritton DB, Folz JC, Lebeck LK, Nehlsen-Cannarella SL. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 1993;166:45–54.
- 26 Zarcone D, Tilden AB, Cloud G, Friedman HM, Landay A, Grossi CE. Flow cytometry evaluation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1986;94:247–55.
- 27 Motzer SA, Tsuji J, Hertig V, Johnston SK, Scanlan J. Natural killer cell cytotoxicity: a methods analysis of ⁵¹chromium release versus flow cytometry. *Biol Res Nurs* 2003;5:142–52.

-
- 28 Pollock RE, Zimmerman SO, Fuchshuber P, Lotzova E. Lytic units reconsidered: pitfalls in calculation and usage. *J Clin Lab Anal* 1990;4:274–82.
- 29 Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A *et al.* Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005;105:3051–7.
- 30 Ruggeri L, Capanni M, Urbani E *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097–100.
- 31 Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E *et al.* NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:84–90.
- 32 Smyth MJ, Swann J, Kelly JM *et al.* NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med* 2004;200:1325–35.

Contact :
ImunoBran Luxembourg et France
www.imunobran.lu
+352 621 707 719

